

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YER ÇEKİMİNİN TÜKÜRÜK BEZLERİNİN PROTEİN
YAPISINA OLAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Dt. Didem DAĞDEVİREN

Oral Diagnoz ve Radyoloji Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA

2014

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YER ÇEKİMİNİN TÜKÜRÜK BEZLERİNİN PROTEİN
YAPISINA OLAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Dt. Didem DAĞDEVİREN

Oral Diagnoz ve Radyoloji Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Sema Dural

ANKARA
2014

Anabilim Dalı : Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi
 Program : Oral Diagnoz ve Radyoloji
 Tez Başlığı :Yer Çekiminin Tükürük Bezlerinin Protein Yapısına Olan Etkisinin İncelenmesi

Öğrenci Adı-Soyadı : Didem Dağdeviren
 Savunma Sınavı Tarihi :01.09.2014

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Mürvet Hyran
 H.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi

Tez danışmanı: Prof. Dr. Sema Dural
 H.Ü Diş Hekimliği Fakültesi

Üye: Prof. Dr. Tuncer Özen
 GATA Diş Hekimliği Fakültesi

Üye: Doç. Dr. Serdar Uysal
 H.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi

Üye: Doç. Dr. Berna Çağırankaya
 H.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi







ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü , Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof.Dr. Ersin FADILLOĞLU
 Müdür

TEŞEKKÜR

Diş hekimliği öğrenciliğimden başlayarak doktora eğitimim boyunca devam eden desteği, anlayışı ve bana olan güveni ile her zaman yanımda olan tez danışmanım, sevgili hocam Prof. Dr. Sema DURAL'a,

Tez çalışmam için bana tüm sabrı ve anlayışı ile elektron mikroskobu kullanmayı öğreten, engin bilgi birikimini ve deneyimlerini aktaran Sayın Prof. Dr. Arthur HAND'e,

Bu tez çalışmasının yürütülmesini destekleyen NASA ve University of Connecticut Health Center'a,

Tez çalışmasına görüşleriyle katkıda bulunan ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Mürvet HAYRAN'a,

Lisans ve doktora eğitimim süresince üzerimde emeği olan H.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi'nin tüm öğretim üyelerine,

Hayatım boyunca ilgi, özveri ve sonsuz destekleri ile her zaman yanımda olan sevgili annem Ayşe OTLU ve sevgili babam Dr. Osman OTLU'ya,

Hoşgörüsü, anlayışı ve sonsuz desteği ile beni her zaman yüreklendiren sevgili eşim Ömür Erdiñ DAĞDEVİREN'e,

Sevgi, saygı ve tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Dağdeviren, D. Yer çekiminin tükürük bezlerinin protein yapısına olan etkisinin incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Oral Diagnoz ve Radyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2014. Tükürük bezlerinden salgılanan proteinlerin hücre içi lokalizasyonları ve miktarlarındaki değişiklikler çevresel, hormonal ve fizyolojik faktörlere karşı sistemik cevabın bir göstergesidir. Yer çekiminin birçok organ ve sistem fonksiyonunu değiştirdiği bilinmektedir. Tükürük bezi sekresyon granüllerinde bulunan proteinler de tükürüğe salgılanarak yer çekimi etkisinin izlenmesini sağlar. Salgılanan proteinler açısından insanlarda da benzerinin olmasının yanısıra, yapısal ve fonksiyonel olarak insan tükürük bezlerine benzemelerinden dolayı kemirgen hayvanların tükürük bezleri, insanlarda yer çekimi değişikliğine karşı oluşan cevabın incelenmesine yardımcı olur. Bu tez çalışmasının amacı; yeryüzü kontrol grubu ile uçuş deney grubu hayvanlarının tükürük proteinlerinin bazal seviyelerinin ölçülerek; yer çekiminin, protein ekspresyonu ve proteinlerin hücresel dağılımına etkisinin incelenmesidir. Sekizer adet erişkin fareden oluşan; uçuş deney grubu ve yeryüzü kontrol grupları arasındaki karşılaştırmalar, immunogold işaretleme yöntemi ile geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda tükürükteki androjen bağlayıcı protein (SABP α), epidermal büyüme faktörü (EGF), parotis sekresyon proteini (PSP), protein kinaz A'nın düzenleyici birimi II (RII) ve prolinden zengin protein (PRP) uçuş deney grubunda yeryüzü kontrol grubuna göre daha yüksek miktarda saptanmıştır. Yarım ay hücrelerinden salgılanan parotis proteini (DCPP), sinir büyüme faktörü (NGF), müsin 19 (Muc 19), submandibuler bez protein C (SMG-C) yeryüzü kontrol grubunda uçuş kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. İleri çalışmalar yer çekimi değişikliğine karşı insan vücudu reaksiyonun ölçülmesini sağlayan tükürük testlerinin geliştirilmesini sağlayacaktır. Böylece yer çekiminin biyolojik sistemler üzerine etkisi ile ilgili bilgi birikimi ve pratik uygulama potansiyeli de artacaktır.

Anahtar Kelimeler: Sekresyon proteinleri, yer çekimi, tükürük bezleri, immunohistokimya

Bu proje, NASA tarafından NNX09AP13G No'lu proje olarak desteklenmiştir.

ABSTRACT

Dağdeviren, D. Evaluation of the effects of the gravity on protein structure of salivary glands. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Oral Diagnosis and Radiology, Ankara, 2014. Alterations in intracellular location and quantity of salivary secretion proteins are indicative of systemic responses to environmental, hormonal and physiologic factors. It is known that gravity alters multiple organ and system functions. Salivary gland secretory granule proteins secreted into saliva enable to monitor the effects of gravity. In terms of the existence of similar secretion proteins in humans, as well as structural and functional similarities of rodent salivary glands to that of humans, rodent salivary glands aid in evaluating human responses to gravity. The objectives of this thesis study are to measure the basal level of salivary proteins of ground control and flight experimental animals and to determine the effects of gravity on protein expression and cellular distribution of proteins. Comparisons between flight experimental group and ground control group, consisting of eight mice each, were performed by immunogold labeling method using transmission electron microscopy (TEM). Analyses showed that salivary androgen binding protein (SABP α), epidermal growth factor (EGF), parotid secretion protein (PSP), the regulatory subunit II (RII) of protein kinase A and proline-rich protein (PRP) were found in higher amounts in flight experimental group than ground control group. Demilune cell and parotid protein (DCPP), nerve growth factor (NGF), mucin 19 (MUC 19), submandibular gland protein C (SMG-C) were found higher amounts in ground control group than flight experimental group. Further studies will lead to the development of salivary tests for measuring the reactions of human body reaction against the gravity changes. Thus, the knowledge and also the practical application potential about the effects of the gravity on biological systems will increase.

Key words: Secretory proteins, gravity, salivary glands, immunohistochemistry

This project was supported by NASA as project No. NNX09AP13G.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tükürük Bezlerinin Yapısı	3
2.1.1. Seröz Hücreler	3
2.1.2. Müköz Hücreler	4
2.1.3. Miyoepitelyal Hücreler	4
2.1.4. Kanallar (Duktus)	4
2.1.5. Bağ Dokusu Elemanları	5
2.2. Tükürük Bezlerinin Sınıflandırılması	6
2.2.1. Büyük Tükürük Bezleri	6
2.2.2. Küçük Tükürük Bezleri	7
2.3. Farelerde Tükürük Bezlerinin Gelişimi ve Büyümesi	7
2.4. Tükürük Salgısının İçeriği ve Görevleri	9
2.5. Tükürük Sekresyonunun Moleküler Mekanizması	12
2.5.1. Sıvı ve Elektrolit Sekresyonu	12
2.5.2. Protein Sekresyonu	13
2.6. Tükürük Salgısının Kontrolü	14
2.6.1. Sempatik Kontrol	15
2.6.2. Parasempatik Kontrol	15
2.7. Uçay Uçuşunun Vücut Sistemleri Üzerine Etkileri	16
2.8. Elektron Mikroskobu	17
2.8.1. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)	17

2.8.2. Tarayıcı Elektron Mikroskobu (SEM)	19
2.8.3. Örnek Hazırlama İşlemleri	19
2.8.4. İmmunogold İşaretleme Yöntemi	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
4. BULGULAR	32
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR	69
EKLER	
Ek 1. Etik Kurul İzni	

SİMGELER VE KISALTMALAR

BMP	Kemik morfojenik protein
BSA	Bovın serum albümin
CSPI	Ortak tükürük bezi protein
DCPP	Yarım ay hücrelerinden salgılanan parotis proteini
Dk	Dakika
ECM	Hücre dışı matriks
Eda	Ektodisplasin
Edar	Ektodisplasin reseptörü
EGF	Epidermal büyüme faktörü
IL	İnterlökin
KS	Kraniyal sinir
kV	Kilovolt
LR	London rezin
Muc 19	Müsin 19
n	Nervus
NGF	Sinir büyüme faktörü
NGS	Normal keçi serumu
Nm	Nanometre
PBS	Tuzlu fosfat tamponu
PKA RII	Protein Kinaz A'nın düzenleyici birimi II
PRP	Prolinden zengin protein
PSP	Parotis sekresyon proteini
SABP	Tükürükteki androjen bağlayıcı protein
SEM	Tarayıcı elektron mikroskobu
sIgA	Tükürükteki immunoglobulin A
SMG-C	Submandibuler bez protein C
TEM	Geçirimli electron mikroskobu
μ m	Mikrometre
μ l	Mikrolitre

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Geçirimli Elektron Mikroskobunun (TEM) şematik çizimi	18
3.1. Farelerin uzaya gönderildiği hayvan kapatma kutuları: Animal enclosure module (AEM)	22
3.2. Kesitleri kesmek için kullanılan ultramikrotom aleti	24
3.3. Rezin blokların mikroskop altında yamuk şekilde trimlenmesi, trimlenme sonrası elde edilen rezin blok (sağ alt köşedeki resim)	25
3.4. Kesitlerin kalınlığının belirlenmesinde kullanılan renk skalası	26
3.5. İnce kesitlerin gridlerin mat yüzeyinde toplandıktan sonra kurutulmaya bırakılması	27
3.6. Gridlerin antikör solüsyonlarıyla inkübasyonu işlemi	29
3.7. Gridlerin inkübasyon işlemi sonrası porselen kaplarda yıkanması	30
4.1. Submandibuler tükürük bezi asinus hücreleri sekresyon granüllerinin (SG) anti-NGF antikoru ile immunogold işaretlenmesinin elektron mikroskobu görüntüsü	32
4.2. NGF proteininin uçuş ve yeryüzü kontrol grubu farelerinde ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğu dağılımı	34
4.3. Submandibuler tükürük bezi terminal tübül hücreleri sekresyon granüllerinin (SG) anti-SMG-C antikoru ile immunogold işaretlenmesinin elektron mikroskobu görüntüsü	35
4.4. SMG-C proteininin uçuş ve yeryüzü kontrol grubu farelerinde ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğu dağılımı	37
4.5. Submandibuler tükürük bezi müköz hücrelerinin (M) anti-PRP antikoru ile immunogold işaretlenmesinin elektron mikroskobu görüntüsü	37
4.6. PRP proteininin uçuş ve yeryüzü kontrol grubu farelerinde ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğu dağılımı	39
4.7. Submandibuler tükürük bezi asinus hücreleri sekresyon granüllerinin (SG) anti-EGF antikoru ile immunogold işaretlenmesinin elektron mikroskobu görüntüsü	40

4.8.	EGF proteininin uçuş ve yeryüzü kontrol grubu farelerinde ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğu dağılımı	42
4.9.	Submandibuler tükürük bezi müköz hücrelerinin (M) anti-SABP α antikoru ile immunogold işaretlenmesinin elektron mikroskobu görüntüsü	42
4.10.	SABP α proteininin uçuş ve yeryüzü kontrol grubu farelerinde ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğu dağılımı	44
4.11.	Sublingual tükürük bezi sekresyon granüllerinin (SG) anti-PSP antikoru ile immunogold işaretlenmesinin elektron mikroskobu görüntüsü	45
4.12.	PSP proteininin uçuş ve yeryüzü kontrol grubu farelerinde ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğu dağılımı	46
4.13.	Sublingual tükürük bezi sekresyon granüllerinin (SG) anti-RII antikoru ile immunogold işaretlenmesinin elektron mikroskobu görüntüsü	47
4.14.	RII proteininin uçuş ve yeryüzü kontrol grubu farelerinde ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğu dağılımı	49
4.15.	Sublingual tükürük bezi müköz hücrelerinin (M) anti-Muc 19 antikoru ile immunogold işaretlenmesinin elektron mikroskobu görüntüsü	49
4.16.	Muc 19 proteininin uçuş ve yeryüzü kontrol grubu farelerinde ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğu dağılımı	51
4.17.	Sublingual tükürük bezi seröz yarım ay hücresi sekresyon granüllerinin (SG) anti-DCPP antikoru ile immunogold işaretlenmesinin elektron mikroskobu görüntüsü	52
4.18.	DCPP proteininin uçuş ve yeryüzü kontrol grubu farelerinde ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğu dağılımı	53
4.19.	Sublingual tükürük bezi seröz yarım ay hücresi (SYH), çekirdek (çek), müköz asinus hücrelerinin (M) bazolateralinde bulunan miyoepitelyal hücre (MEH)	54
4.20.	Submandibuler tükürük bezi müköz asinus hücreleri (M), çekirdek (çek), granüllü endoplazmik retikulum (gER), mitokondri (Mit), hücreler arası bağlantı (HAB)	55
4.21.	Submandibuler tükürük bezi terminal tübül hücreleri (TT), çekirdek (çek), mitokondri (Mit)	55

- 4.22. Submandibuler tükürük bezi granüler (G) çizgili kanal, çekirdek (çek),
mitokondri (Mit) 57
- 4.23. Submandibuler tükürük bezi granüler (G) interkalar kanal, çekirdek (çek),
lümen (L) 58

TABLOLAR

	Sayfa
3.1. Uçuş deney grubu ve yeryüzü kontrol grubu hayvanlarının ortalama vücut ağırlığı ve günlük su ve yiyecek tüketimleri	23
3.2. İmmunohistokimya işlemi için kullanılan antikorlar	28
4.1. NGF proteininin submandibuler bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu	33
4.2. NGF proteininin submandibuler bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu	33
4.3. SMG-C proteininin submandibuler bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu	35
4.4. SMG-C proteininin submandibuler bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu	36
4.5. PRP proteininin submandibuler bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu	38
4.6. PRP proteininin submandibuler bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu	38
4.7. EGF proteininin submandibuler bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu	40
4.8. EGF proteininin submandibuler bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu	41
4.9. SABP α proteininin submandibuler bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu	43
4.10. SABP α proteininin submandibuler bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu	43
4.11. PSP proteininin sublingual bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu	45
4.12. PSP proteininin sublingual bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu	46
4.13. RII proteininin sublingual bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu	47

4.14.	RII proteininin sublingual bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu	48
4.15.	Muc 19 proteininin sublingual bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu	50
4.16.	Muc 19 proteininin sublingual bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu	50
4.17.	DCPP proteininin sublingual bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu	52
4.18.	DCPP proteininin sublingual bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu	53

1. GİRİŞ

Tükürük oral kavitenin sağlığı ve homeostazisinin sağlanmasında önemli rol oynayan faktörleri içeren, büyük ve küçük tükürük bezlerinden salgılanan bir sıvı karışımıdır. Tükürüğün fonksiyonları; erken çürüklerde remineralizasyon, ağızda yara iyileşmesi, sindirim, tat alma, oral patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite olarak sıralanabilir.

Bununla birlikte tükürük bezlerinden salgılanan proteinler, oral kavitenin homeostazisinin sağlanmasında en önemli faktörlerdir. Bu proteinlerin hücre içi lokalizasyonları ve miktarlarındaki değişiklikler ise çevresel, hormonal ve fizyolojik faktörlere karşı sistemik cevabın bir göstergesidir (1-3).

Yer çekiminin birçok organ ve sistem fonksiyonunu değiştirdiği bilinmektedir (4-7). Ancak literatür incelendiğinde yer çekiminin oral kavitede yarattığı değişiklikler konusunda yapılan çalışmaların nadir olduğu görülmüştür (8,9). İnsanlı veya insansız uzay uçuşlarında hayvan kullanılan deneyler, yer çekimi değişikliklerinin hücresel ve moleküler seviyede etkilerini araştırma imkanı sağlamaktadır. Bu çalışmalar sonucunda uzay uçuşuna bağlı olarak yani yer çekimsiz ortamın, bazı proteinlerin ekspresyonunu azaltırken bazılarını arttırdığı bildirilmiştir (9,10). Kemirgen hayvan tükürük bezlerinin yapısal ve fonksiyonel olarak insan tükürük bezlerine benzemesi nedeniyle kemirgen hayvanlar üzerinde yapılan histolojik ve morfolojik çalışmalar insanlarda yer çekimi değişikliğine karşı oluşan cevabın araştırılmasına yardımcı olur. Yapılan çalışmalar bazı kemirgen hayvan tükürük bezlerinden insanda da benzeri olan birçok proteinin salgılandığını göstermiştir (11,12). Proteinlerin lokalizasyonu ve dağılımının belirlenmesinde ise immunohistokimyasal yöntem kullanılır (13,14).

Tıpta ve diş hekimliğinde kullanımı gittikçe artan diagnostik tükürük testlerinin çürük riski tayini, periodontal hastalıklar, kandida, helicobakter pilori enfeksiyonları, baş boyun kanserleri teşhisinde kullanıldığı bilinmektedir (15). Tükürük bezi sekresyon granüllerinde bulunan proteinler, tükürüğe salgılanarak çevresel, fizyolojik, patolojik ve hormonal etkinin izlenmesini sağlar. Böyle bir tükürük testi uzay uçuşlarına karşı insan vücudu reaksiyonunun gözlenmesinde de kullanılabilir.

Bu tez çalışması uzaydaki yer çekimsiz ortamın deney hayvanlarında oluşturduğu hücresel değişikliklerin tanımlanabilir olduğu ve bu değişikliklerin tükürük ve tükürük bezlerindeki spesifik sekretuar protein ekspresyonları ölçülerek izlenebileceği hipotezine dayanmaktadır.

Amaç; yeryüzü kontrol grubu ile uçuş deney grubu hayvanlarının tükürük proteinlerinin bazal seviyelerinin ölçülerek, uzay uçuşunun protein ekspresyonu ve proteinlerin hücresel dağılımına etkisinin incelenmesidir. Sekizer adet erişkin fareden oluşan; uçuş deney grubu ve yeryüzü kontrol grupları arasındaki karşılaştırmalar, immunogold işaretleme yöntemi ile geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak yapılmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar birçok fizyolojik sistem ve metabolik yolda fonksiyonu bilinen proteinlerle ilgili bilgi birikimine katkı sağlamanın yanısıra uzay uçuşu ile ilgili teorik bilgi ve pratik uygulama potansiyelini de arttıracaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tükürük Bezlerinin Yapısı

Tükürük bezleri salgılarını kanallar aracılığıyla oral kaviteye boşaltan ekzokrin bezlerdir. Salgı yapan son kısımlar (asinus) ve kanallar bezi oluşturur. Salgı yapan son kısımlar asiner, tübüler ve tübülo-asiner şekillerde olabilir. Asinuslar seröz, müköz veya seromüköz hücrelerden oluşur. Tükürük bezlerinin etrafı bağ dokusu kapsülü ile çevrilidir ve septalar aracılığıyla lob ve lobüllere ayrılmıştır. İnnervasyonu ve beslenmesi bağ dokusundaki kan damarları ve sinirler aracılığıyla sağlanır.

2.1.1. Seröz Hücreler

Seröz hücreler merkezi yerleşimli yuvarlak çekirdeğe sahip piramit şekilli hücreler olup lümen çevresinde asiner dizilim gösterirler. Müköz hücrelerin distal kısmını saran yarım ay şeklinde seröz hücrelere Gianuzzi yarım ayı denir ve bunlar submandibuler ve sublingual tükürük bezlerinde bulunur. Sıçan sublingual bezlerinde hızlı dondurma ve klasik kimyasal fiksasyon tekniği uygulanarak yapılan çalışma sonucu Gianuzzi yarım aylarının klasik kimyasal fiksasyon tekniğinde ortaya çıkan bir artefakt olduğunu görüşü de ileri sürülmüştür (16).

Her ikisi de elektron mikroskobunda elektron yoğun granüllere sahiptir ve granüllü endoplazmik retikulumları (gER) birçok paralel sisternadan oluşmaktadır. gER çekirdeğin bazalinde veya lateralinde yer alır. Golgi kompleksi birçok kesecik, vezikül ve sisternadan oluşur, çekirdeğin apikalinde veya lateralinde yer alır. Hücre zarında yüzey alanını arttıran çok sayıda katlantılar mevcuttur. Bu katlantılar yüzey alanını arttırmaları ve içerdikleri mitokondrilerle enerji desteği sağlamaları açısından molekül taşınmasında önemli rol oynamaktadır. Seröz hücreler ayrıca lizozom da içermektedir.

Seröz hücrelerin tanımı konusunda birçok araştırmacı farklı görüşe sahip olsa da morfolojik ve histokimyasal metotların yanısıra biyokimyasal yöntemlerin uygulanması seröz hücrelerin salgı içeriğinin belirlenmesine büyük katkı sağlamıştır . Yapılan biyokimyasal çalışmalar seröz hücre salgılarının sadece proteinlerden ibaret olmayıp glikolipid, glikoprotein, proteoglikan, glikosphingolipid gibi çeşitli glikokonjugatlar da ihtiva ettiğini göstermiştir (17).

2.1.2. Müköz Hücreler

Müköz hücreler bazal yerleşimli oval bir çekirdek ile çekirdeğin üst kısmı ve çevresinde müsinojen granülleri bulunan, lümen çevresinde tübüler dizilim gösteren hücrelerdir. Elektron mikroskopunda elektron-lusent olarak görülen granüller genellikle fiksasyon sırasında membranlarının parçalanması nedeniyle birkaç granülün bir araya gelip birleştiği geniş, içi boş granüller olarak gözlenir. Golgi kompleksi ve gER morfolojisi hücrenin sekresyon aşamasına göre farklılık göstermektedir. Müköz hücreler mukus salgılamaya başladığında gER geniş sisternalarıyla çekirdeğin altında yer alırken, mukus ile dolu hücrelerde gER sisterna sayısı azalarak hücrenin bazalinde veya granüllerin lateralinde yer alır. Golgi kompleksi ise mukusla kaplı olduğu için görülmez.

2.1.3. Miyoepitelyal Hücreler

Miyoepitelyal hücreler isminden da anlaşıldığı üzere düz kas hücrelerine benzeyen epitelyal kökenli hücrelerdir. Düz kas hücreleri gibi birbirine paralel uzanan mikrofilamentleri olup kasılabilme özelliğine sahiptir. Bazal lamina ile interkalar kanallar veya asinuslar arasında yer alır. İnsanlarda çizgili kanallarda da bulunabilir (18). Morfolojileri konumlarına göre farklılık göstermektedir; asinus çevresindeki miyoepitelyal hücreler birçok dallı uzantılara sahiptir ve asinusları dört bir yandan çevreleyen yıldızsı şekildedir. İnterkalar kanalla ilişkili olan miyoepitelyal hücreler ise daha az uzantıya sahip, kanala paralel uzanan iğ şekilli hücrelerdir. Hücre uzun eksenine paralel, iğ şekilli çekirdekleri vardır (19).

Parasempatik ve sempatik sinir sistemi stimülasyonu sonucu kasılan miyoepitelyal hücreler primer tükürüğün asinuslardan kanal sitemine iletilmesini sağlar. Aynı zamanda tükürük sekresyonu sırasında parankimaya destek sağlar. Miyoepitelyal hücreler ürettikleri proteinler ile tümör hücrelerinin proliferasyonunu, invazyonunu ve metastazını inhibe ederek tümör baskılayıcı olarak görev yaparlar (20,21). Miyoepitelyal hücrelerin ürettiği proteinlerin belirlenmesinde en uygun yöntem immunohistokimya'dır.

2.1.4. Kanallar (Duktus)

Tükürük bezi kanalları interkalar kanallar ile başlayıp sırasıyla çizgili kanallar (intralobüler) ve boşaltım kanalları (interlobüler) ile devam eder, en son ana boşaltım

kanalı ile salgılarını oral kaviteye boşaltırlar. Kemirgen hayvanların submandibuler tükürük bezlerinde bu kanallara ek olarak, interkalar ve çizgili kanallar arasında granüler kanallar da bulunmaktadır. Granüler kanallar erkek farelerde dişi farelere göre daha gelişmiştir, bu gelişim farklılığında androjen hormonlar, tiroid hormonu gibi çeşitli hormonlar etkili olmuştur. Granüler kanalların fonksiyonu tam olarak bilinmese de epidermal büyüme faktörü (EGF), sinir büyüme faktörü (NGF), renin ve kallikrein proteaz gibi çeşitli biyolojik materyaller salgıladıkları bilinmektedir (22).

Asinularda salgılanan primer tükürük miyoepitelial hücreler aracılığıyla ilk olarak interkalar kanallara iletilir. Bu kanallar tek katlı kübik epitel hücreleriyle döşeli en küçük tükürük bezi kanallarıdır. Asinustan interkalar kanallara geçiş yavaş yavaş olurken interkalar kanallardan çizgili kanallara veya granüler kanallara geçiş hızlı olur. Dişi farelerde sekresyon granüllerine sahip interkalar kanallar saptanmıştır, bunlara granüler interkalar kanal denir. Granüler interkalar kanallar asinus ile interkalar kanalların birleşim yerlerinde görülür. Ayrıca granüler kanalların interkanal kanallarla birleşim yerinde çizgili granüler kanallar da bulunmaktadır (23).

İnterkalar kanallardan sonra gelen çizgili kanallar tek katlı prizmatik epitelle kaplıdır. Bazal membran katlantıları ve katlantılar arasına yerleşmiş olan mitokondriler bu kanallara çizgili görünüm verir. Tükürük bezi salgısı çizgili kanallardan geçerken sodyum (Na^+) ve klor (Cl^-) emilirken, potasyum (K^+) ve bikarbonat (HCO_3^-) salgılanır.

Çizgili kanallar boşaltım kanallarına açılır. Boşaltım kanalları; tek katlı prizmatik epitel, çok katlı değişici epitel, çok katlı prizmatik ve kübik epitel gibi birçok farklı epitelle döşelidir (24). Ana boşaltım kanalı genellikle çok katlı prizmatik epitelle kaplıdır, ancak oral mukozaya yaklaştıkça çok katlı yassı epitele doğru değişim göstermektedir.

2.1.5. Bağ dokusu elemanları

Tükürük bezlerinin etrafı kapsülle çevrilidir. Kapsülden uzanan kan damarları ve sinirler içeren septalar, tükürük bezini lob ve lobüllere ayırır. Bağ dokusu fibroblast, makrofaj, mast hücreleri, plasma hücreleri, lenfositler gibi hücreler ve proteoglikan, glikoprotein, kollajen ve elastik fibrillerle kaplı zemin maddesinden oluşur.

2.2. Tükürük Bezlerinin Sınıflandırılması

Tükürük bezleri büyük tükürük bezleri ve küçük tükürük bezleri olarak ikiye ayrılır. Büyük tükürük bezleri submandibuler, sublingual ve parotis tükürük bezi olmak üzere üç çeşittir. Küçük tükürük bezleri ise ağız içinde buldukları bölgeye göre bukkal, labial, palatin ve lingual tükürük bezleri olarak adlandırılır. Fareler ve insan tükürük bezlerinin birçok ortak özelliği vardır.

2.2.1. Büyük Tükürük Bezleri

Büyük tükürük bezleri bileşik tübülo-asiner bezlerdir. Kanallar ve asinulardan oluşan bezler: sapları kanallara, taneleri ise asinularda karşılık gelen üzüm salkımına benzetilebilir (25).

Parotis bezi, insanlardaki en büyük tükürük bezidir. Anatomik olarak dış kulağın önünde yer alır ve tabanı arcus zygomaticus'ta, tepesi angulus mandibulada olan piramit şeklindedir. Diğer büyük tükürük bezlerinden farklı olarak salgısı serözdür. Ductus parotideus (Stenon kanalı) masseter kasının yüzeyselinden geçer, buccinator kasını delerek üst 2. molar diş hizasında ağız boşluğuna açılır. Farelerde ise parotis bezi kulağın arkasında ve altındadır, subkutenöz yağ dokusu ile çevrilidir. Farelerde parotis tükürük bezi ile lakrimal bez birbirine anatomik olarak çok yakın olduğu için diseksiyon yapılırken birbiriyle karıştırılmamalıdır. Boşaltım kanalı alt molar dişler hizasında oral kaviteye açılır.

Submandibuler tükürük bezi insanlarda mylohyoid kasın altında yer alır. İnsanlarda farelerden farklı olarak interkalar kanal ile çizgili kanal arasında uzanan granüler kanallar yoktur. Bu bez seröz salgısı baskın olan karışık yapıda bir bezdir. Ductus submandibularis (Wharton kanalı) ağız tabanında bulunan frenulum linguae'nın her iki yanındaki caruncula sublingualis'e açılır. Farelerde ise submandibuler tükürük bezi en büyük tükürük bezidir ve seröz içeriği fazla olan serömüköz salgı yapar. Ön boyun orta hattında sublingual bez ile birlikte submandibuler lenf nodları ile sternum arasındadır. Boşaltım kanalı alt kesici dişlerin posterioruna açılır.

Sublingual tükürük bezi insanlarda mylohyoid kasın üstünde yer alır. Müköz ağırlıklı karışık salgı yapar. Ductus sublingualis (Bartholin kanalı) birçok minör boşaltım kanalı ve ductus submandibularis ile birlikte caruncula sublingualis'e açılır. Farelerdeki ön boyun orta hattında submandibuler bezlerin lateralinde

submandibuler lenf nodları ile komşudur. Boşaltım kanalı alt kesici dişlerin posterioruna açılır. Farelerde ise sublingual tükürük bezi sadece müköz salgı yapar (26).

2.2.2. Küçük Tükürük Bezleri

Küçük tükürük bezleri yapısal olarak büyük tükürük bezlerine benzemekle birlikte ufak farklılıklar göstermektedir (27). Örneğin küçük tükürük bezleri kapsülle çevrili değildir, dolayısıyla komşu submukoza ve kas lifleriyle iç içedir. Kanallar büyük tükürük bezlerine oranla daha az gelişmiştir. Küçük tükürük bezleri salgısı genellikle müköz karakterdedir. Küçük tükürük bezleri, ağız içinde buldukları bölgeye göre bukkal, labial, palatinal ve lingual tükürük bezleri olarak adlandırılır.

Lingual tükürük bezleri birkaç çeşittir. Anterior lingual tükürük bezleri (Nuhn Blandin) müköz ağırlıklı karışık salgı yapar, dilin ventral yüzeyindedir. Boşaltım kanalı lingual frenulumun her iki yanına açılır. Posterior lingual bezler (Weber) müköz bezler olup dilin lateral yüzeyinde ve circumvallate papillarının posteriorunda yer almaktadır. Boşaltım kanalı lingual tonsillerin yakınına açılır. Posterior lingual seröz bezler (von Ebner bezi) circumvallate papillalarının altında bulunur. Boşaltım kanalı tat tomurcukları içeren circumvallate papillalarına açılır, bu nedenle tat almada görevli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca Von Ebner bezinden sindirimde görevli amilaz, lipaz enzimleri salgılanmaktadır (28). Von Ebner bezi ise küçük tükürük bezleri arasında saf seröz salgı yapan tek tükürük bezidir.

2.3. Farelerde Tükürük Bezlerinin Gelişimi Ve Büyümesi

Farelerde ilk olarak submandibuler tükürük bezi, bir gün sonra sublingual tükürük bezi, son olarak da parotis ve küçük tükürük bezleri gelişir. Fare submandibuler tükürük bezi, karışık bir bez olması itibariyle hem müköz hem de seröz hücrelerin incelenmesine olanak tanınması, ayrıca kültür ortamında kolay üremesi, kültür ortamında dallanma morfogenezi ve epitelyal-mezenşimal etkileşimin canlı hücrelere benzer şekilde gerçekleşmesi nedeniyle uzun yıllardır tükürük bezlerinin gelişimi ile ilgili çalışmalarda kullanılmaktadır (29). Submandibuler tükürük bezi gelişimi; tomurcuk öncesi, ilk tomurcuk, yalancı glanduler, kanalikuler ve son tomurcuk evresi olmak üzere beş evreye ayrılır (30). Embriyonik on bir buçukuncu günde ağız tabanını döşeyen epitel çoğalmaya başlar ve gelişmekte olan

dile komşu kalın bir epitel tabakası oluşur. Bu evre **tomurcuk öncesidir**. Sublingual tükürük bezi ise submandibuler tükürük bezinin yanında embriyonik on iki buçukuncu günde gelişmeye başlar. Kalınlaşmış epitel tabakası alttaki mezenşim dokusuna doğru invajinasyon yaparak ağız yüzeyine bir kanalla bağlı ilk tomurcuk oluşumuna neden olur. Bu kanal daha sonra submandibuler ve sublingual tükürük bezlerinin ana boşaltım kanallarını (Wharton ve Bartholin kanalı) oluşturur. Bu evreye **ilk tomurcuk evresi** denir. Embriyonik on üç buçukuncu günde başlayan **yalancı glandüler evrede** ise submandibuler bezde oluşan tomurcuk dallanır ve yeni tomurcuklar oluşur. Embriyonik on beş buçukuncu gün civarında olan **kanalikuler evrede** ise lümeni çevreleyen hücrelerin proliferasyonu ve ortasındaki hücrelerin apoptozisi sonucu lümen oluşur. Epitelyal hücre proliferasyonu her evrede gerçekleşirken apoptozis sadece kanalikuler evrede lümen oluşumu ile başlar. Caspase 3, P53 ve procaspase 8 apoptosiste etkili moleküllerdir (31,32). Ayrıca survivin, Bcl2 and NF κ B bariyer görevi yaparak apoptozisin lümen ortasındaki hücrelerden ileriye yayılmasını engeller (33-36). Submandibuler tükürük bezi kültürüne interlekin 6 (IL-6) ve tümör nekroz faktör eklenmesi dallanma ve epitelyal hücre proliferasyonunda artışa neden olur (31,34). Ancak IL-6'dan yoksun farelerde yapılan bir çalışmada IL-6 eksikliğinin submandibuler tükürük bezi gelişimine olumsuz bir etkisinin olmadığı saptanmıştır (36). Ektodisplasin (Eda) ve reseptörü Edar'ın lümen formasyonu ve farklılaşması üzerinde farklı etkileri vardır. Hücre kültürüne Eda eklenmesi dallanmada artışa yol açarken reseptör Edar'ın çözülebilir formu dallanmada azalmaya neden olur. Eda'dan yoksun farelerde ise lümen formasyonu olumsuz etkilenir (37). Embriyonik on yedi buçukuncu günde ise terminal uçlardaki ve olası kanallardaki lümen oluşumu tamamlanır. Bu evreye **son tomurcuk evresi** denir.

Epitel ile mezenşimin birbirinden ayrılıp daha sonra tekrar birleştirildiği deneysel çalışmalar epitel ile mezenşim arasındaki etkileşimin tükürük bezlerinin gelişiminde önemli rol oynadığını göstermektedir. Tükürük bezi mezenşimi ile meme bezleri (38,39), oral ve nazal kavite (40), hipofiz bezi (41) epitelinin birleştirildiği çalışmalarda epitel hücreleri tükürük bezi benzeri dallanma göstermiştir. Tükürük bezi epitelinin akciğer mezenşimi ile birleştirildiği çalışmalarda da kullanılan

mezenşim hücre miktarına bağlı olarak tükürük bezi benzeri dallanma gelişimi gözlenmiştir (42,43).

Mezenşimal kontrolün dallanma morfogenezi üzerindeki etkisi belirgin olmasına rağmen fonksiyonel farklılaşma üzerinde etkisinin olmadığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Meme bezi epitelinin submandibuler tükürük bezi mezenşimi ile birleştirildiği çalışmalarda epitel tükürük bezi benzeri dallanmaya sahip iken süt üretimi gözlenmiştir (38). Gelişen bezin morfoloji ve hücre farklılaşması birleşmenin yapıldığı evreye göre de farklılık göstermektedir. Örneğin embriyonik on iki buçukuncu gün hipofiz bezi epiteli ile fare submandibuler bezi mezenşimi birleştirildiğinde amilaz üretmezken embriyonik sekiz buçukuncu gün fare submandibuler bezi mezenşimi ile birleştirildiğinde amilaz üretimine devam eder (41).

Hücre dışı matriks (ECM) tükürük bezlerinin dallanmasını düzenleyen fibril proteinleri, aksesuar proteinler, glikozaminoglikanlar, büyüme düzenleyici proteinler ve proteazlardan oluşur. Epitel hücreleri tarafından salgılanan bazal membran ECM'nin bir tabakasıdır, laminin (34,44), tip 4 kollajen (45), nidojen (46) glikozaminoglikanlar (47), proteoglikan (48) ve perlekan gibi heparan sulfat proteoglikanları içerir (49). ECM'nin tükürük bezlerinin dallanmasındaki düzenleyici görevini anlamak için yapılan birçok çalışma kollajen, heparan sülfat, fibronektin degradasyonunun dallanmayı inhibe ettiğini göstermiştir (50-52). Ayrıca alfa6, integrin, epidermal büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü, tümör nekroz faktörü inhibisyonu dallanmayı azaltır (53-55). Submandibuler bez kültürüne tümör büyüme faktörü, kemik morfojenik proteini 7 (BMP7), glukokortikoidler, sonic hedgehog eklenmesi dallanmayı arttırırken aktivin β A ve β B, BMP4 dallanmayı inhibe eder (55-57).

Sonuç olarak bütün bu çalışmalar tükürük bezi normal asinus paterni gelişebilmesi için uygun ECM gerektiğini göstermiştir.

2.4. Tükürük Salgısının İçeriği ve Görevleri

Tükürük büyük ve küçük tükürük bezi salgıları, dökülen ağız epitel hücreleri, mikroorganizmalar ve ürünleri, yiyecek artıkları, inflamasyon hücrelerinden oluşan karışık bir sıvıdır. Submandibuler tükürük bezi, müsin ağırlıklı tükürük salgılar ve toplam tükürüğün yaklaşık %60'ını oluşturur. Parotis bezi, enzimce zengin sulu

tükürük salgılar ve toplam tükürüğün %30'una katkıda bulunur. Sublingual bez de müsin açısından zengin visköz bir tükürük salgılar ve toplam tükürüğe yaklaşık %5 katkıda bulunur. Tükürüğün içeriği ve miktarı salgı yapan tükürük bezine, parasempatik ve sempatik sinir sistemi uyarımına, günlük ritime ve çeşitli hastalık durumlarına göre farklılıklar gösterse de normal koşullar altında günde 600 - 1000 mililitre tükürük salgılanır. Bunun %99'u su, %1 veya daha az kısmı inorganik iyonlar ve organik sekresyon proteinlerinden oluşur. Tükürükteki esas iyonlar Na^+ , K^+ , kalsiyum (Ca^{+2}), Cl^- , HCO_3^- ve hidrojen fosfat (HPO_4^{-2}) olmakla birlikte az miktarda magnezyum (Mg^{+2}), sülfat (SO_4^{-2}), flor (F^-), tiyosiyanat (SCN^-) ve iyot (I^-) iyonları bulunmaktadır.

- **α -Amilaz:** α -amilaz insan ve fare tükürüğünde bol miktarda bulunan çok fonksiyonlu bir enzimdir. Nişastayı hidrolize ederek karbonhidratların ağızda sindirimini başlatır. Oluşan glikozun ağızdaki bakteriler tarafından fermentasyonu sonucu laktik asit oluşur ve bu durum diş yüzeyinde demineralizasyona neden olur. Ayrıca amilaz diş yüzeyine bakterilerin tutunmasını sağlayarak plak oluşumunda da rol oynar (58).

- **İmmunoglobulin A (sIgA):** Tükürük bezi kanal ve asinusları yakınındaki plazma hücreleri tarafından üretilen IgA, tükürükte en çok miktarda bulunan immunoglobulindir. Virüsleri, bakteri toksinleri ve enzimlerini nötralize etmek, bakterilerin diş yüzeyine tutunmasını engellemek gibi görevleri vardır. sIgA tükürükteki lizozim, laktoferrin, tükürük peroksidazı gibi bağışıklık savunma faktörleriyle sinerji yaparak antibakteriyel etkinliğini artırır (59).

- **Müsin:** Müsin mukusun ana bileşeni olup karbonhidrat (%50-80) ve proteinlerden oluşur. Konuşma, yemek yeme sırasında kayganlık (lubrikasyon) sağlar. Mukus, ağız içi sert ve yumuşak dokuları örterek kimyasal, mekanik ve mikrobiyal etkenlere karşı korur (60). Visköz özelliği sayesinde protezlerin tutuculuğunu artırır (61). Ayrıca mikroorganizmaların tutunmasını ve/veya atılımını sağlayarak oral mikroflora dengesini korur.

- **Peroksidaz enzimi:** Tükürükte miyeloperoksidaz ve tükürük peroksidaz enzimi olmak üzere iki çeşit peroksidaz enzimi mevcuttur. Peroksidaz enzimlerinin antibakteriyel, antiviral, antifungal etkiye sahip olmasının yanısıra hidrojen peroksit

(H₂O₂)'in hipotiyosiyana (OSCN⁻) dönüşümünü katalizleyen antitoksik fonksiyonu da vardır (62).

Tükürüğün çok çeşitli görevleri mevcuttur:

- **Koruma:** İçeriğindeki su sayesinde ağızdaki bakteri, yiyecek artıklarını yıkayarak uzaklaştırma, müsin sayesinde dokulara kayganlık kazandırma, zararlı etkenlere karşı koruyucu tabaka oluşturma görevi vardır.

- **Tamponlama:** Tükürüğün pH'sı 6.7-7.4 arasında değişir. Tükürük bileşiminde bulunan bikarbonat ve fosfat iyonları karbonhidrat metabolizması sonucu oluşan fermentasyon asitlerini tamponlama vazifesi görür. Ayrıca tükürükte bulunan proteinler, plak bakterileri tarafından amonyak ve üreye parçalanır. Amonyak ve üre de tükürük pH'sını arttırarak tamponlama yapar.

- **Pelikül oluşumu:** Tükürükteki bazı proteinler diş yüzeyine yapışarak ince bir film tabakası oluşturur, buna pelikül denir. Bu proteinlerin bir kısmı (prolinden zengin proteinler, statherin) kalsiyum bağlayarak diş yapısını korurken bazıları (müsin, amilaz) da bakterilerin tutunmasını sağlayarak plak oluşumuna neden olur.

- **Remineralizasyon:** Asidik prolinden zengin protein, histidinden zengin polipeptit (histidin), sistatin diş yüzeyine kalsiyum bağlanmasını sağlayarak yüzey sertliğini ve demineralizasyona karşı direnci arttırır. Tirozinden zengin protein (statherin) ise diş minesine tükürükten aşırı kalsiyum, fosfat iyonu çökmesini önleyerek dişlerin mineral dengesini korur. Ayrıca tükürükteki flor iyonu da başlangıç çürüğünün remineralizasyonunda etkilidir.

- **Antimikrobiyal etki:** Lizozim, peroksidaz, immunoglobulin A (Ig A), laktoferrin, müsin, prolinden zengin glikoproteinler, aglütininler antimikrobiyal etkiye sahiptir (63). Laktoferrin demir bağlayıcı özelliği sayesinde bakterilerin büyümesini engeller. Lizozim bakteri hücre duvarındaki polisakkaritleri hidrolize ederek hücre yıkımına neden olur (64).

- **Doku tamiri:** Tükürükte EGF, NGF gibi doku büyümesi ve farklılaşmasını, yara iyileşmesini sağlayan çeşitli büyüme faktörleri ve proteinler mevcuttur (65,66).

- **Sindirim:** Tükürük yiyecekleri ıslatıp kayganlaştırarak bulamaç haline getirir. Tükürükte bulunan amilaz sayesinde karbonhidratların sindirimi ağızda başlar. Lingual seröz bezlerden salgılanan lipaz enzimi de trigliseritlerin sindirimine yardımcı olur.

- **Tat alma:** Tükürük besinleri suda çözülebilir hale getirerek tat cisimciklerinin uyarılmasına yardımcı olur.

2.5. Tükürük Sekresyonunun Moleküler Mekanizması

Thaysen ve diğ. (67) tükürük salgılanmasının iki aşamadan oluştuğunu açıklamıştır. İlk aşamada asiner hücreler izotonik plazma benzeri NaCl'dan zengin primer tükürük salgılar. İkinci aşamada ise tükürüğün içeriği çizgili kanallar ve boşaltım kanallarından geçerken akış hızına bağlı olarak değişime uğrar, böylece NaCl reabsorpsiyonu ve K⁺ sekresyonu meydana gelir. Hızlı tükürük akışında tükürüğün kanal epiteli ile daha kısa süre temas etmesi nedeniyle Na⁺, Cl⁻ ve HCO₃⁻ konsantrasyonu artarken, K⁺ konsantrasyonu azalır. Yavaş tükürük akışında ise tam aksi bir iyon konsantrasyon dağılımı söz konusudur. Kanal epitelinin, suya az geçirgen olması nedeniyle son oluşan tükürük NaCl'den zayıf, hipotonik tükürüktür.

2.5.1. Sıvı ve Elektrolit Sekresyonu

Parasempatik kolinerjik stimülasyon tükürük oluşumunu aktive eder. M3 muskarinik alt türü sıvı sekresyonu ile ilişkili esas reseptördür (68,69). Asetilkolin sıvı sekresyonunda etkili olan parasempatik nörotransmitterdir. Asetilkolin asiner hücrelerde bazolateral konumlu muskarinik reseptörlere bağlanır, fosfolipaz C aktive olur, inositol trifosfat ve diasetilgliserol oluşur. Sitozolda Ca⁺² birikir. Artan hücre içi Ca⁺² apikal Cl⁻ ve bazolateral K⁺ kanallarının açılarak Cl⁻ ve K⁺ 'un dışarı çıkmasını sağlar. K⁺ sodium potasyum pompası aracılığıyla hücre içine girerken Na⁺ dışarı çıkar ve Na⁺ hücreler arası Na⁺ seçici sıkı bağlantı aracılığıyla lümeneye geçer.

Sıvı ve elektrolit sekresyonu suyun hücreler arası aquaporinler aracılığıyla iletimi ile iyon transportasyonu ve kanal proteinlerinin serosal (bazolateral) yüzeyden luminal (apikal) yüzeye geçişi arasındaki koordinasyona bağlıdır (70). Sıvı sekresyonunun asiner hücrelerin apical membranındaki majör su kanalı olan Aqp5 eksik farelerde azaldığı saptanmıştır.

Na⁺ hücre içine Na⁺/H⁺ değiştiricisi veya Na⁺ kanalı ile girer ve Na⁺/K⁺-ATPaz pompası aracılığıyla çıkar. Cl⁻ ise hücre içine Cl⁻/HCO₃⁻ değiştiricisi, Cl⁻ kanalları ile girer, bazolateral Cl⁻ kanalları ile çıkar. H⁺ iyonları Na⁺/H⁺ değiştiricisi ile lümeneye geçerken luminal K⁺/H⁺ değiştiricisi ile tekrar hücre içine girer, böylece lümen ve sitozol arasındaki K⁺ ve Na⁺ elektronötral denge sağlanır. K⁺, Na⁺/K⁺-

ATPaz aracılığıyla hücre içine girerken, luminal K^+/H^+ değiştiricisi and bazolateral K^+ iyon kanalları ile dışarı çıkar. *Nkcc1* geni (*Slc12a2*) tarafından kodlanan bazolateral $Na^+-K^+-2Cl^-$ taşıyıcısı başta olmak üzere bazolateral Na^+/H^+ , Cl^-/HCO_3^- taşıyıcısı arasındaki koordineli aktivite hücre içi Cl^- alımından sorumlu mekanizmalardır. Na^+/H^+ taşıyıcısı (NHE1), karbonik anhidraz II enziminin katalizlediği CO_2 'in hidrasyonu reaksiyonu sonucu oluşan HCO_3^- birikimine neden olur (71,72). *AE2* geni tarafından kodlanan bazolateral Cl^-/HCO_3^- değiştiricisi aracılığıyla HCO_3^- dışarı çıkarken Cl^- hücre içine girer (73).

2.5.2. Protein Sekresyonu

Sekresyon proteinleri gER ile ilişkili ribozomlarda sentezlendikten sonra endoplazmik retikulumda hidrosilasyon, disülfid bağı oluşumu, N-bağlı glikozilasyon gibi çeşitli modifikasyonlara uğrar (74). Küçük veziküllerle golgi kompleksinin cis yüzeyine aktarıldıktan sonra O-bağlı glikozilasyon, fosforilasyon, yağ açılme gibi birtakım modifikasyonlar daha geçirip olgunlaşıp yoğunlaştıktan sonra sekresyon vezikülleri içinde apikal sitoplazmada depolanır. Hücre belirli uyarılarla tetiklendiği zaman sekresyon vezikülleri hücre zarıyla birleşerek içeriğini ekzositoz yoluyla lümeneye boşaltır.

Sempatik nörotransmitter nöroepinefrinin stimulasyonu sonucu nöroepinefrin hücre yüzeyindeki β -adrenerjik reseptöre bağlanır. G proteinleri ile etkileşir ve adenilat siklaz enzimi aktif hale gelerek ATP'den cAMP sentezini sağlar (25). cAMP hücre içi sinyal aktarımında görevli ikincil habercidir, protein kinaz A (PKA)'nın işlevinde yer alır. Protein kinaz A normalde iki katalitik (C), iki düzenleyici (R) birimden oluşan aktif olmayan bir enzimdir. Düzenleyici birimlerindeki yapısal farklılıktan dolayı tip I ve II olmak üzere iki çeşit PKA vardır. cAMP artışı PKA'yı aktive eder, katalitik ve düzenleyici birimlerin ayrılmasına yol açar. Katalitik birimler sekresyon vezikül içeriğinin ekzositozunda etkili protein substralarındaki serin, treonin zincirlerinin fosforilasyonunu sağlar. Düzenleyici birimler ise cAMP'ye bağlanarak cAMP bağımlı protein fosforilasyonunu kontrol eder. Ayrıca ankor proteinleri ile birleşerek hücre içindeki PKA lokalizasyonunun belirlenmesini sağlar (75).

α -adrenerjik, kolinerjik ve substance P reseptörleri stimulasyonu sonucu artan sitoplazmik Ca^{+2} , sıvı ve elektrolit sekresyonunun yanısıra az miktarda protein ekzositozunda da etkilidir (64).

2.6. Tükürük Salgısının Kontrolü

Tükürük bezleri salgısı otonom sinir sistemi ile kontrol edilir. Parasempatik ve sempatik sinir sistemlerinin stimulasyonu sonucu salgılanan tükürüğün miktarı ve içeriği farklı olmasına rağmen, her iki sinir sisteminin de tükürük salgılanmasına yol açtığı kabul edilmektedir (76). Günümüze kadar yapılan çalışmalar sinir dağılımının farklı canlı türleri arasında farklılıklar göstermesiyle birlikte aynı canlı türlerinde farklı tükürük bezlerinde de çeşitlilikler gösterdiğini ortaya koymuştur (77). Örneğin adrenerjik sinirler sıçanlarda submandibuler bezde bol miktarda bulunurken parotis bezinde daha az miktarda ve sublingual bezde ise çok nadir bulunmaktadır (77).

Sinir hücreleri ile parankima arasında epilemmal ve hipolemmal olmak üzere iki tür nöroefektör ilişki vardır (77). Schwann hücrelerinin sitoplazmik uzantılarıyla çevrili miyelinsiz aksonlar parankimal bazal membranın dışında 100-200 nm uzaklıkta iken oluşan nöroefektör ilişkiye epilemmal ya da subepitelyal denir. Aksonların bazal membrana penetre olarak arada 10-20 nm boşluk bırakarak kurdukları yakın ilişkiye ise hipolemmal ya da intraepitelyal denir. Epilemmal ve hipolemmal nöroefektör ilişki herhangi bir akson tipine özgü olmayıp adrenerjik veya kolinerjik aksonlarda görülebilir, bu nedenle morfolojik farklılıklara rağmen hipolemmal ve epilemmal nöroefektör ilişki arasında fonksiyonel bir farklılık bulunamamıştır (25).

Aksonlar birden fazla hücreyi innerve edebildiği gibi aynı hücre birden fazla akson tarafından hipolemmal ve epilemmal ilişki ile innerve edilebilir (77). Her bir aksonda nörotransmitter vezikülleriyle kaplı varikozite denilen yapılar mevcuttur. Nörotransmitterlerin kendilerine özgü reseptörlerle etkileşimi sonucu tükürük bezi hücrelerinde sıvı ve elektrolit sekresyonu, ekzositoz, miyoepitelyal hücrelerin kasılması gibi çeşitli reaksiyonlar gelişir. Nöroepinefrin sempatik sinir sistemine ait nörotransmitter olup α -adrenerjik ve β -adrenerjik reseptörleri aktive eder. Asetilkolin ise parasempatik sinir sistemine ait nörotransmitterdir ve kolinerjik reseptörleri aktive eder. Nöroepinefrin ve asetilkolin gibi iki temel nörotransmitter dışında vasoaktif

intestinal peptid (VIP), substance P, kalsitonin gen ilişkili peptid, nöropeptid Y gibi fonksiyonu tam olarak açıklanamayan peptid transmitterler de söz konusudur (77, 78).

2.6.1. Sempatik Kontrol

Pregangliyonik sempatik sinir lifleri medulla spinalisin torakal parçasından köken alır ve superior servikal gangliyonda sinaps yaptıktan sonra, kan damarlarıyla birlikte tükürük bezine ulaşır. Sempatik sinir sisteminin tükürük salgılanması için hangi hücreyi aktive ettiği tükürük bezi türüne göre farklılık göstermektedir. Sempatik sinir sistemi stimülasyonu sıçan submandibuler tükürük bezlerinde asiner ve granüler hücrelerin degranülasyonunu sağlar (79). Garrett ve Anderson (80) sıçan sublingual tükürük bezlerinde yaptıkları çalışmada sempatik stimülasyonun tübüloasiner hücreler ve Gianuzzi yarım aylarında hiçbir etkisi yokken çizgili kanallardan aşırı miktarda müsin granülleri ve glikojen salınımına yol açtığını göstermiştir. Genel olarak sempatik sinir sistemi protein açısından zengin, parasempatik sistem stimülasyonuna oranla daha az miktarda tükürük salgılanmasına neden olur, ayrıca tükürük bezini besleyen kan damarları üzerinde vazokonstriktör etkiye sahiptir.

2.6.2. Parasempatik Kontrol

Nucleus salivatorius superiordan köken alan pregangliyonik parasempatik sinir lifleri n.facialis (Kraniyal Sinir (KS) VII) ile birlikte beyin sapından ayrıldıktan sonra fasiyal sinirin dalı olan chorda tympani, lingual sinir (n. trigeminus (KS V) dalı) ile birlikte submandibuler gangliyonda sinaps yapar. Postgangliyonik parasempatik sinir lifleri submandibuler ve sublingual tükürük bezlerine ulaşır.

Nucleus salivatorius inferiordan çıkan pregangliyonik parasempatik lifler ise n. glossopharyngeus (KS IX) ile beyinden ayrılırlar. Sonra n.tympanicusa katılırlar. Daha sonra n.petrosus superficialis minor içinde ganglion oticum gelirler. Ganglion oticumdan çıkan postgangliyonik lifler n.trigeminus'un dalı olan n.auriculotemporalis ile parotis bezine ulaşır.

Genel olarak parasempatik sinir sistemi stimülasyonu bol miktarda sulu ancak protein içeriği düşük tükürük salgısını aktive ettiği görüşü hakim iken bu durum tükürük bezi türüne ve hücre çeşidine göre farklılık göstermektedir. Garrett ve diğ. (79) çalışmalarında parasempatik sistemin sıçan submandibuler tükürük bezlerinde

asinus ve granüler kanallar üzerinde etkisinin olmadığını saptamışlardır. Sıçan sublingual tükürük bezlerinde yapılan diğer bir çalışma ise parasempatik sinir sistemi stimülasyonunun tübüloasiner hücreler ve Gianuzzi yarım aylarından az miktarda degranülasyona neden olurken çizgili kanallarda hiçbir etkisinin olmadığını göstermiştir (80). Ayrıca parasempatik sinir sistemi tükürük bezini besleyen kan damarlarında vazodilasyona neden olur.

2.7. Uzay Uçuşunun Vücut Sistemleri Üzerine Etkileri

Uzay uçuşu sırasında canlılar sıcaklık, nem, atmosferik basınç, radyasyon açısından yer yüzünden farklı çevresel koşulların olduğu yer çekimsiz bir ortama maruz kalır. Yer çekiminin ve diğer çevresel koşulların vücut sistemleri üzerinde birçok etkisi mevcuttur.

Yer çekimi kuvvetinin bulunmadığı ortamda kemik yapımı azalır, idrarda Ca^{+2} atılımı artar ve kemik mineral dansitesi azalır (5). Kemik yapımı ve yıkımı arasındaki denge kemik yıkımı lehine olduğu için serum Ca^{+2} konsantrasyonu artar ve paratiroid hormonu azalır. Böbrek taşı oluşumu riski artar.

Kardiyovasküler sistem üzerindeki etkileri ise kan ve hücreler arası sıvı hacminde azalma, ortostatik hipotansiyon, azalmış kalp kası kütlesi ve kalp fonksiyonu şeklindedir (6).

Yer çekimi mide içeriği ile mukoza arasındaki fiziksel teması etkileyerek emilimi azaltır. Gastrointestinal mikroflora değişir. Tat ve koku hassasiyetine etki ederek iştah kaybı ve yeme alışkanlığında değişikliğe yol açabilir (4).

Uzay uçuşu immün sistem hücreleri fonksiyonu ve dağılımı üzerinde de etkilidir. Lenfositler azalır, lökositler özellikle de nötrofiller artar (7). Doğal öldürücü hücre, nötrofil ve monosit hücreleri fonksiyonu ve gecikmiş aşırı duyarlılık reaksiyonu azalır. Stresle ilişkili immün sistem değişiklikleri serum kortisol ve katekolamin seviyesine yansır (81). Stres durumunda artan kortisol ve katekolamin hormonları immün cevabı baskılar.

Uzayda galaktik kozmik ışınlar ve solar radyasyon olmak üzere iki çeşit radyasyon mevcuttur (82). Dünyada manyetik alanın radyasyon yönünü saptırması ve atmosferin koruyucu özelliği sayesinde yeryüzü kozmik ışın ve solar radyasyonu uzaya göre daha düşüktür. Radyasyonun etkileri radyasyon çeşiti, hücrelerin radyasyon duyarlılığı, emilen radyasyon dozu gibi çeşitli faktörlere bağlı olsa da

genel olarak akut etki ve gecikmiş etki olarak ikiye ayrılır. Mide bulantısı, kusma, halsizlik, ishal gibi akut radyasyon etkileri yüksek doz radyasyona maruz kaldıktan kısa bir süre sonra ortaya çıkabilir. Kanser, katarakt, immün fonksiyon bozukluğu, genetik hasar gibi gecikmiş etkiler ise yıllar sonra ortaya çıkabilir.

2.8. Elektron Mikroskobu

Elektron mikroskobu elektron tabancası tarafından oluşturulan yüksek enerjili elektron demetini kullanarak görüntü elde eden bir mikroskop çeşididir. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ve tarayıcı elektron mikroskobu (SEM) olmak üzere iki temel tipi mevcuttur.

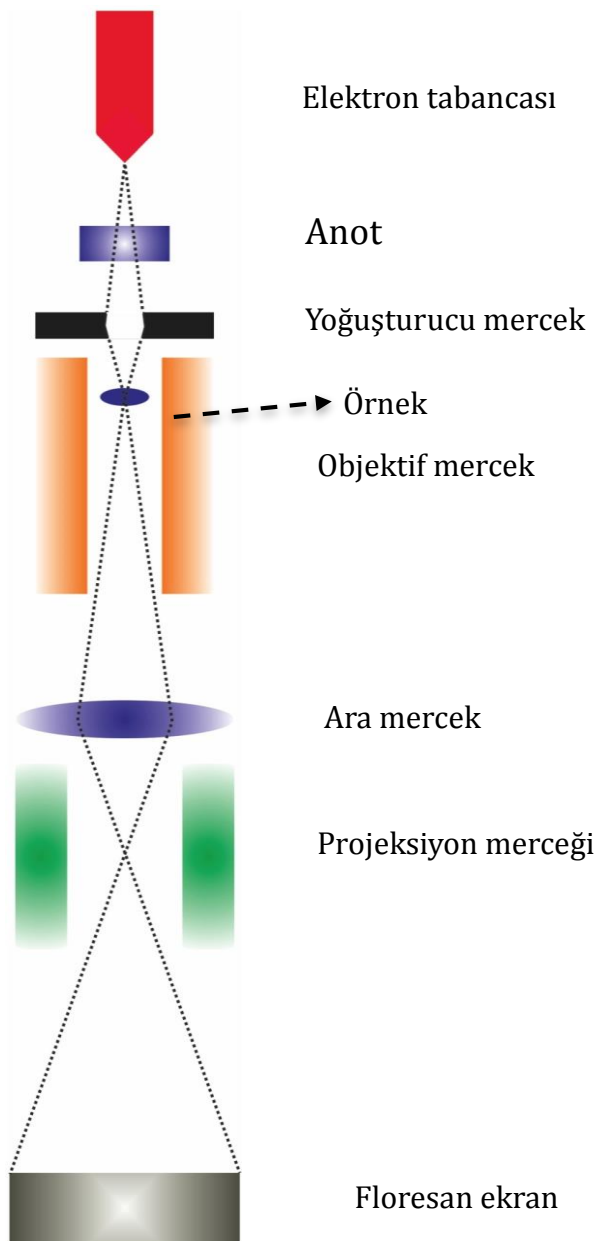
Elektron mikroskobu tıp, mühendislik, elektronik, mineraloji gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Tıpta ağırlıklı olarak böbrek hastalıkları ve tümörlerin teşhisinde kullanılmaktadır (83). Ayrıca hücrelerin yapısıyla ilgili detaylı bilgiler vermesi nedeniyle son yıllarda genetik çalışmalarda da elektron mikroskobundan faydalanılmaktadır. Elektron mikroskobu, hücrelere özgü antikorların kullanıldığı immunohistokimyasal çalışmalarda ilgili antijenin hücre içi dağılımı ve lokalizasyonunun belirlenmesini sağlar. Kısa elektron dalgaları nedeniyle TEM ile elde edilen görüntü çözünürlüğü (0.1-0.2 nm) ışık mikroskobundan 1000 kat daha fazladır. Bu durum incelenen yapılar hakkında nanometrik ölçüde detayları görmemizi sağlar.

Her teknikte olduğu gibi elektron mikroskobunun da avantajlarının yanısıra çeşitli dezavantajları da mevcuttur. Elektron mikroskopları pahalı aletlerdir ve özel eğitilmiş kişiler tarafından kullanılmalıdır. Vibrasyona hassas oldukları için stabil bir ortamda muhafaza edilmelidirler. Elektron mikroskobunda incelenecek örnekler cansız doku örnekleri ile sınırlıdır. Çünkü yüksek vakum ve enerjiden dolayı canlı dokular zarar görebilir. Örnekler elektron mikroskobunda incelenmeden önce zaman alıcı bir takım işlemlerden geçer. Elektronların zayıf penetrasyon özelliği nedeniyle doku kalınlığı 50-100 nm civarı ince kesitler şeklinde olmalıdır.

2.8.1. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

Geçirimli elektron mikroskobu, çok ince kesitli örnek içinden geçirilen yüksek enerjili elektronların görüntülenmesi prensibine dayanır. Elektronlar elektrik akımı ile ısıtılmış katottan anoda doğru vakumlu ortamda hareket eder. Katotla anot

arasına uygulanan yüksek potansiyel farkı (60-100 kV) katottan yayılan elektronları hızlandırır ve elektronlar anottaki açıklıktan ilerleyerek tütün içine girer. Elektromanyetik alana giren elektronlar elektromanyetik merceklerle yön değiştirir. Yoğuşturma merceği ile elektron demeti kesit üzerine odaklanır. Kesitten gelen elektron demeti, örneğin ilk büyütülmüş görüntüsünü oluşturan objektif merceğe odaklanır. Daha sonra bu görüntü projeksiyon merceği ile daha da büyütülerek floresan ekran plak ya da CCD (charge coupled device) kamera üzerine düşürülür (Şekil 2.1). Oluşan görüntü iki boyutlu ve siyah-beyazdır.



Şekil 2.1. Geçirimli Elektron Mikroskobunun (TEM) şematik çizimi.

2.8.2. Tarayıcı Elektron Mikroskobu (SEM)

Tarayıcı elektron mikroskobu (SEM), elektron tabancasından çıkan 2-30 kV potansiyel farka sahip elektron demetinin metalle kaplı örnek yüzeyine çarparak geri yansması veya saçılması prensibine dayanır. Daha sonra yansıyan veya saçılan elektronlar algılayıcılar tarafından yakalanarak yükselticilere aktarılır. Oluşan sinyalin son şekli bilgisayar monitöründe izlenir.

Elektronlar TEM'dekinin aksine kalın kesitli örneğin içinden geçmez, sadece incelenen numunenin yüzeyi tarafından yansıtılır. Bu nedenle daha düşük enerjili elektronlar tercih edilir. SEM ile elde edilen görüntü çözünürlüğü TEM'den daha düşüktür. SEM görüntüleri de iki boyutlu siyah beyazdır ancak çeşitli metotlarla görüntüler renkli ve üç boyutlu şekle dönüştürülebilir.

2.8.3. Örnek Hazırlama İşlemleri

- **Tespit (fiksasyon):** Dokuların mümkün olduğunca canlı organizmadaki bütünlüğünü koruyarak bozulmasını önlemek için yapılan işlemdir. Kullanılan fiksatif ve yöntem örneğin yapısına ve araştırılan bilgiye göre değişmektedir. Örneğin zar ve organellerin yapısını korumak için proteinlere bağlanan gluteraldehit tercih edilirken, biyolojik aktiviteyi korumak için paraformaldehit tercih edilir. Ayrıca paraformaldehit ve gluteraldehit karıştırılarak fiksatif olarak kullanılabilir. Fiksasyon işlemi dokuların fiksatifle immersiyonu veya tüm hayvanın perfüzyonu şeklinde en az 1 saat süren bir işlemdir. Daha sonra fiksatifin pH'ını nötralize etmek için fosfat, kakodilat, kollidin gibi tamponlarda bekletilir.

Morfolojik çalışmalar için esas olarak doymamış yağlarla reaksiyona giren ve zarın kontrastını arttıran osmiyum tetraoksit kullanılır. Osmiyum tetraoksit dokulara yavaş penetre olması nedeni ile küçük boyutlu örneklerde tercih edilir. İmmünoişaretleme yapılacak çalışmalarda antijenitenin korunması adına genellikle osmiyum tetraoksit kullanılmaz.

- **Dehidrasyon:** Su rezinle karışmaz, bu nedenle rezinle gömme işlemi yapılmadan önce dokulardan su uzaklaştırılmalıdır. Dehidrasyon işlemi için kullanılan kimyasal maddeler etanol, aseton, propilen oksit, etilen glikol, polietilen glikoldür. Genellikle dehidrasyona konsantrasyonu düşük alkolle başlanıp konsantrasyon %100 olana kadar gittikçe arttırılır. Epoksi rezin propilen oksitte daha iyi çözünebildiği için propilen oksit ara çözücü olarak kullanılabilir.

- **Gömme:** Gömme işleminin amacı dokulardan ince kesitler almak için doku örneklerine destekleyici ortam sağlamaktır. Gömme işlemi için akrilik rezin ve epoksi rezin olmak üzere iki çeşit rezin kullanılmaktadır. Epoksi rezinler, örneğin Araldite, Polybed, EMBED, çalışması nispeten kolay, immunohistokimyasal çalışmalarda antikorların penetrasyonuna izin veren, elektron bombardımanına dayanıklı, ince kesit alınabilen ve iyi boyanma özelliklerine sahip hidrofobik rezinlerdir. Yüksek viskoziteli olmaları nedeniyle epoksi rezinlerin dokuya infiltrasyon süresi uzundur.

Akrilik rezinler, örneğin LR Gold, LR White, gömme sonrası immunohistokimyasal çalışmalarda sıklıkla kullanılan düşük viskoziteli, hidrofilik rezinlerdir. Düşük sıcaklıkta polimerize olmaları protein denatürasyonunu önler.

Gömme işlemi için örnekler rezinle dolu polietilen veya jelatin kapsüllerin içine konularak ısıtılır veya ultraviyole ışığı ile polimerize edilir.

-**Kesit alma:** Resin bloklara gömülü doku örneklerinin elektron mikroskopunda incelenebilmesi için elektronların kolaylıkla geçebileceği ince kesitler (50-100 nm) alınmalıdır. Bunun için ultramikrotom adı verilen cam veya elmas bıçaklı aletler kullanılmaktadır. Alınan kesitler, ışık mikroskopunda olduğu gibi lamalar üzerine toplanmak yerine elektron penetrasyonuna izin veren bakır veya nikel gridler üzerinde toplanır.

- **Boyama:** Işık mikroskopunda kullanılan boyalar incelenen yapıların farklı renklerde görülmesini sağlarken elektronların kısa dalga boyuna sahip olmaları nedeniyle bu boyalar elektron mikroskopunda gözle görülmez. Elektron mikroskopunda elektronların emilimini veya ince kesitlerden geçmesini sağlayan ağır metaller kullanılır. En sık kullanılan boyalar uranil asetat ve kurşun sitrattır. Osmiyum tetraoksit de kontrast artırma özelliğine sahiptir. Ayrıca dehidrasyon sırasında alkole uranil asetat eklenmesi veya fiksasyon sırasında glüteraldehite tannik asit eklenmesiyle yapılan blok boyama da kontrastı arttırmada kullanılabilir.

Diğer bir boyama çeşidi ise pozitif boyamanın aksine incelenen yapının kendisinin boyanmayıp çevresinin yoğun boyandığı negatif boyamadır. Negatif boyama virüs, bakteri, hücre organelleri, protein komplekslerinin incelenmesinde kullanılan hızlı ve kolay bir boyama tekniğidir. En sık kullanılan boyalar uranil asetat, uranil format, fosfotungstik asit, metilamin tungstattır.

2.8.4. Immunogold İşaretleme Yöntemi

Hücre ve dokulardaki proteinlerin lokalizasyonu ve dağılımının belirlenmesinde o proteine özgü antikorların kullanılması işlemine immunohistokimya denir. Elektron mikroskobu ile yapılan immunohistokimya çalışmalarında gömme öncesi ve sonrası olmak üzere iki çeşit işaretleme yöntemi mevcuttur. Gömme öncesi immunogold işaretleme yönteminde doku örneği rezine gömülmeden önce 3-80 nm büyüklüğünde altın partiküllerden oluşan kolloidal altınla işaretlenir. Gömme öncesi immunogold işaretleme genellikle yüzey antijenlerinin tespitinde kullanılabilir.

Gömme sonrası immunogold işaretleme ise doku örnekleri rezine gömülüp ince kesitler alındıktan sonra gerçekleştirilir. Gömme bloklarından alınan ince kesitlerdeki hücre içi antijenlerin tespitinde kullanılabilir. Ayrıca tüm blok immunogold işaretlenmediği için bloğun işaretlenmeyen kısmı kontrol grubu olarak ya da diğer işaretleme çalışmaları için kullanılabilir. Gömme sonrası immunogold işaretleme yönteminde dehidrasyon ve rezine gömme işlemleri sırasında protein denatürasyonu nedeni ile antijenite azalabilir.

Immunogold işaretleme yönteminin amacı proteinlere bağlanan antikorların altın partikülleri ile işaretlenerek elektron mikroskobunda gözle görülebilmesini sağlamaktır. Dokudaki proteinin gösterilmesinde genellikle tercih edilen; dokudaki antijene önce altınla işaretli olmayan primer antikor bağlanıp ardından altınla işaretli sekonder antikorun bu primer antikora bağlandığı indirek yöntemdir. İndirek yöntem proteine direk olarak altınla işaretli primer antikorun bağlandığı direkte göre daha hassastır, ancak daha fazla özgül olmayan işaretlenmeye yol açar. Özgül olmayan antijen-antikor bağlanmasını bloklayıcı çeşitli reaktifler ve yıkama işlemleri sayesinde özgül olmayan işaretlenme önlenmeye çalışılır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması, University of Connecticut Health Center Deneysel Hayvanları Etik Kurulu'nun 20.03.2008 toplantı tarihli ve ACC 2008-423 karar numaralı izni ile yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında kullanılan tükürük bezi örnekleri NASA'nın 5-20 Nisan 2010 tarihleri arasında yapılan STS-131 uçuşu ile uzaya gönderilen 8 adet fareden elde edildi. Fareler Animal Enclosure Module (AEM) adı verilen en fazla altı adet erişkin sıçan için yiyecek, su, ışık ve havalandırma içeren hayvan yaşam alanı (habitatları) içinde uzaya yollandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Farelerin uzaya gönderildiği hayvan kapatma kutuları: Animal enclosure module (AEM).

Hem uçuş deney grubu hem de yeryüzü kontrol grubu istedikleri zaman yiyebilecekleri, NASA'nın uzaya yollanan fareler için geliştirdiği yarı katı yiyeceklerle beslenmiştir. Uçuş deney grubu ve yeryüzü kontrol grubu hayvanlarının

ortalama vücut ağırlığı, günlük su ve yiyecek tüketimleri Tablo 3.1’de sunulmuştur (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Uçuş deney grubu ve yeryüzü kontrol grubu hayvanlarının ortalama vücut ağırlığı ve günlük su ve yiyecek tüketimleri.

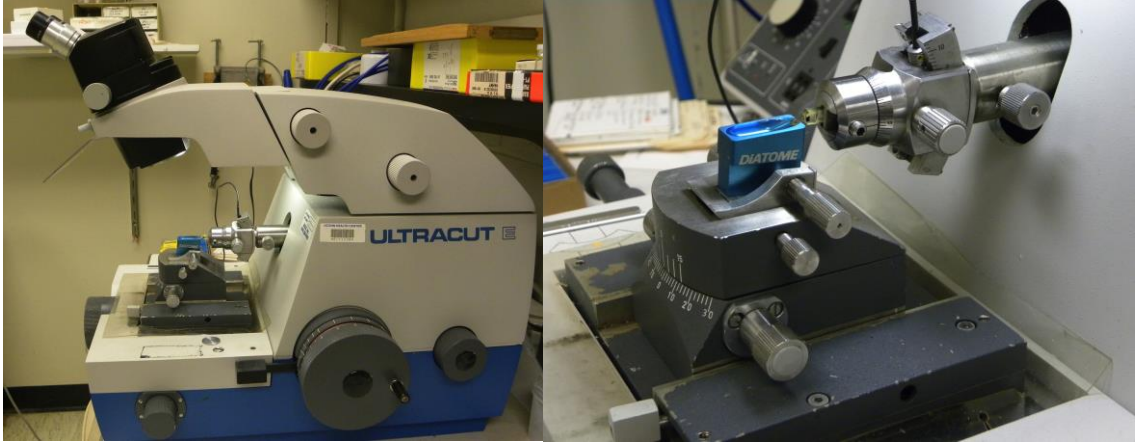
	Fare sayısı	Ortalama Ağırlık (gr)		Günlük Ortalama Tüketim	
		Uçuş Öncesi	Uçuş Sonrası	Yiyecek (gr)	Su (ml)
Uçuş Deney Grubu	8	22.02	20.07	3.5	2.96
Yeryüzü Kontrol Grubu	8	22.03	21.28	4.0	3.9

Filtreleme sistemi ile AEM içerisindeki amonyak, karbondioksit, karbonmonoksit gibi atık maddeler ve kötü koku mümkün olan en az seviyeye indirildi. AEM’lerin üst kısmı farelerin görülmesini sağlayan şeffaf plastik pencere ile kaplıdır. Bu çalışma için 8 adet uçuş, 8 adet kontrol grubu olmak üzere toplam 16 adet erişkin C57BL/6 türü dişi fare kullanıldı. Kontrol grubu da yeryüzünde AEM’ye yerleştirildi. 15 günlük uzay uçuşundan sonra fareler, yeryüzüne iniş yaptıktan 5 saat sonra Prof. Dr. Arthur R. Hand tarafından kesildi. Yeryüzü kontrol grubu ise buldukları yerden kesim yerine ulaşmaları vakit aldığı için 2 gün sonra kesildi. Bütün fareler kesilmeden önce 16 haftalığı.

Diseksiyondan hemen sonra, her bir tükürük bezi %4 paraformaldehit / %0.25 glutaraldehit ile tespit edildi. İlk tespit sonrası morfoloji çalışması için kullanılacak örnekler %2 paraformaldehit/%2.5 glutaraldehitte tespit edildi. Birkaç kez yıkandıktan sonra 4°C’de 0.1 M kakodilat tampon içinde pH 7.4’te saklandı. İmmunohistokimyasal çalışma için doku örnekleri tespit edildikten sonra yıkayıp 0.1 M (molar) kakodilat tampon içinde %1 paraformaldehitte saklandı. Daha sonra University of Connecticut Health Center’a Prof. Dr. Arthur R. Hand’e gönderildi.

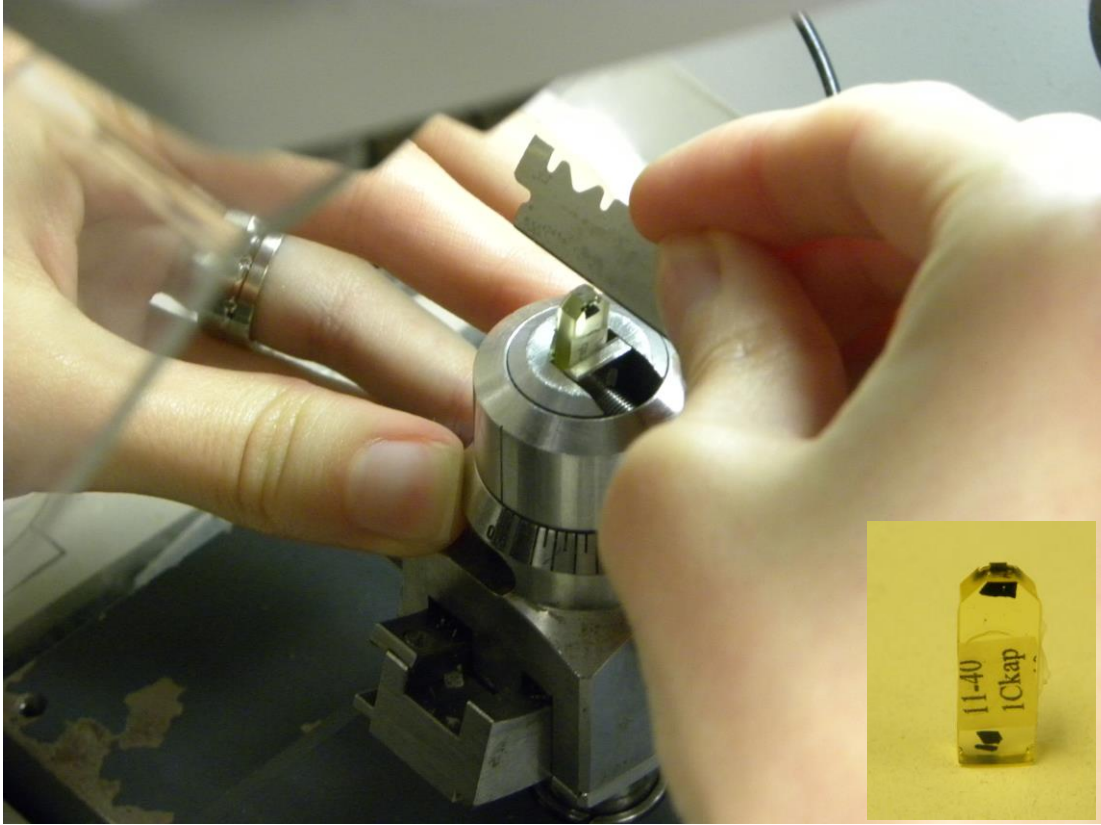
Morfolojik çalışma için doku örnekleri osmiyum tetraoksit ile tekrar tespit edildikten sonra Polybed epoksi rezine gömüldü. İmmunogold işaretleme için doku

örnekleri LR Gold (London Resin) rezin içine yerleştirilerek -20 °C’de ultraviyole ışığı altında polimerize edildi. Ultramikrotom (Reichert Ultracut E) yardımıyla doku parçaları önce yarı ince (1 µm) daha sonra ince kesitler halinde kesildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Kesitleri kesmek için kullanılan ultramikrotom aleti.

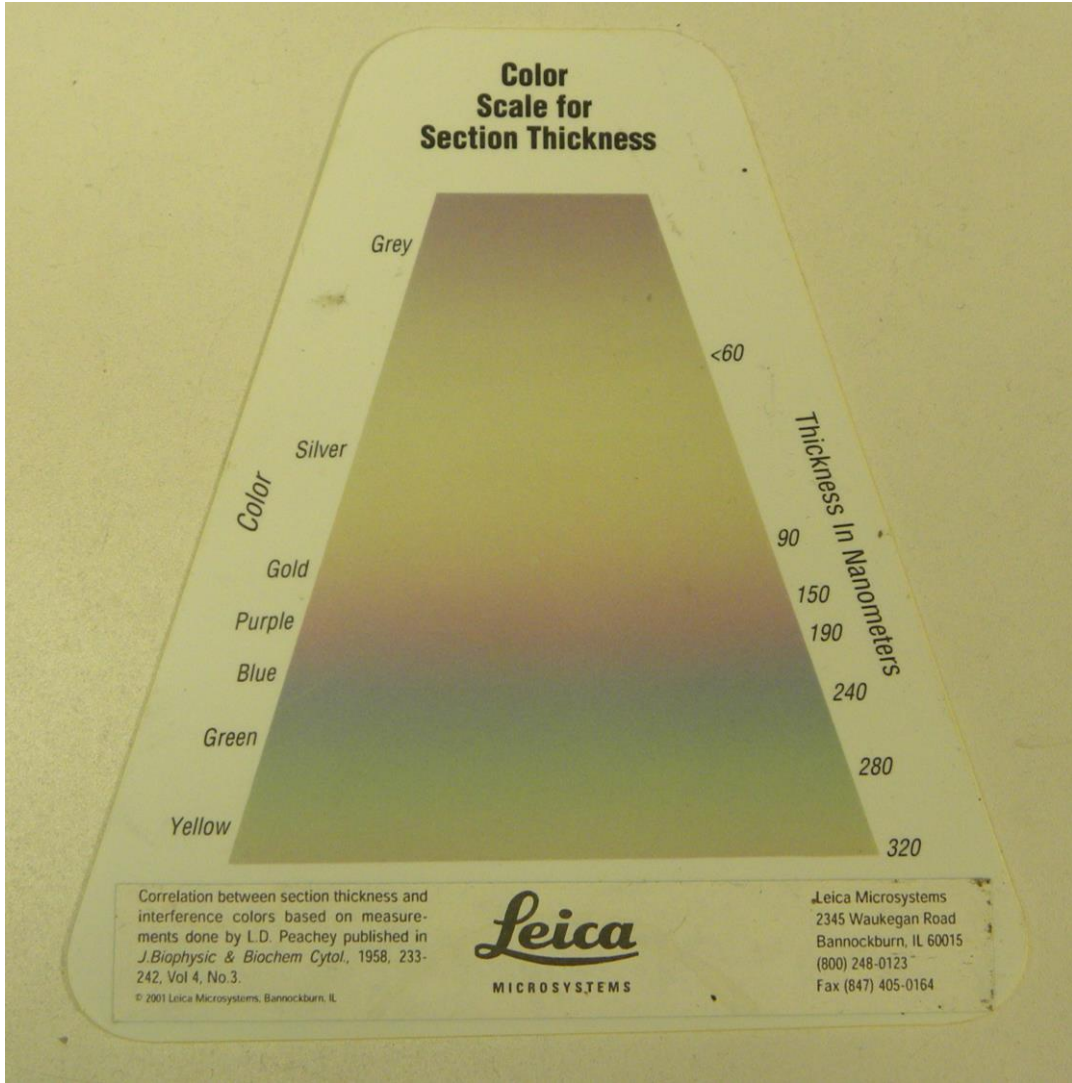
Doku örneği polimerize rezin bloğu içinde yüzeye yakın olmadığından, yüzeydeki fazla rezin jilette trimlendi. Trimleme esnasında yüzeyin düz olmasına dikkat edildi. Daha sonra rezin blokları mikroskop altında, tabanı (tepesinden daha uzun) ve tepesi birbirine paralel, yan kenarlarından biri tabana dik açılı diğeri ise eğimli olan “yamuk” şeklinde trimlendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Rezin blokların mikroskop altında yamuk şeklide trimlenmesi, trimlenme sonrası elde edilen rezin blok (sağ alt köşedeki resim).

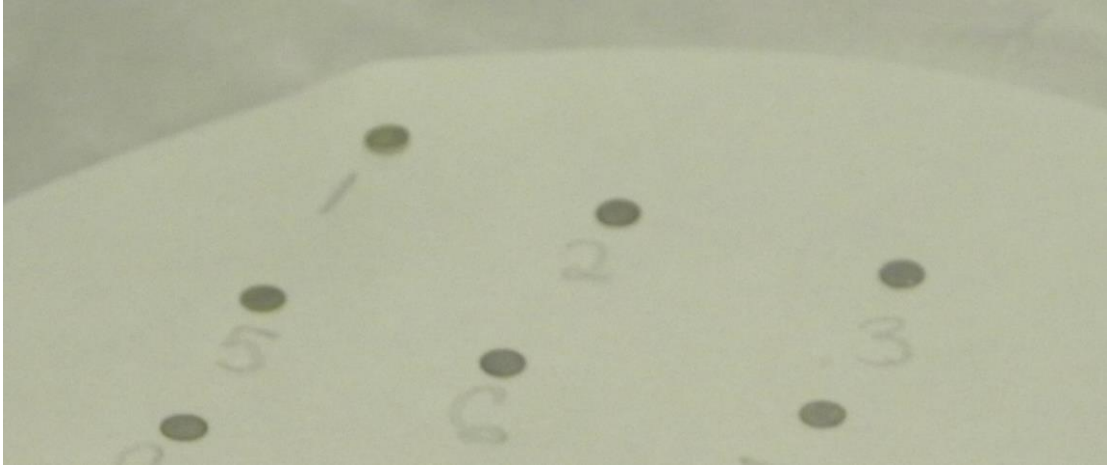
Trimlenmiş rezin bloklar, ultramikrotomun blok taşıyıcı kısmına yerleştirildi. Mevcut stereomikroskop altında, blok yüzeyi elmas bıçağa paralel olacak şekilde hizalandı. Ultramikrotomun dönen kolu çevrilerek bıçağa yaklaştırılan bloktan ince kesitler alındı. Kesitler bıçağın arkasındaki distile suyla dolu havuzda birikti. Suyun seviyesi bıçağı ıslak tutacak şekilde ve havuzun kenarları ile yaklaşık aynı seviyede kalacak şekilde ayarlandı. Alınan yamuk şeklindeki kesitler; ince bir fırça kullanılarak temiz bir lam üzerine damlatılmış olan distile su damlalarının üzerine, düzgün bir şekilde ve kırışmadan konuldu. Lam su buharlaşana kadar ısıtıcı plaka üstünde tutuldu. Ardından metilen blue boyası damlatılıp tekrar ısıtıcı plaka üzerinde kurumaya bırakıldı. Elde edilen yarı ince kesitler ışık mikroskopunda incelenerek, doku fiksasyonunun kalitesi değerlendirildi. Ayrıca, doku örneğinde elektron mikroskopik inceleme yapılmak üzere ince kesit alınacak sahalar belirlendi ve gerekli olmayan kısımlar trimlendi.

Hazırlanan bloklar tekrar ultramikrotoma yerleştirilerek ince kesitler alındı. Kesit kalınlığı kesitlerin beyaz ışık altında sudan yansıyan renk spektrumuna göre belirlendi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Kesitlerin kalınlığının belirlenmesinde kullanılan renk skalası.

Suda biriken altın rengi kesitlerden (80-130 nm) bir veya birkaç tanesi Formvar kaplı nikel gridlerin mat yüzeyinde toplandı (Şekil 3.5). Gridler kesitin olduğu mat yüzey üstte olacak şekilde filtre kağıdıyla kaplı petri kutusunda kurumaya bırakıldı.



Şekil 3.5. İnce kesitlerin gridlerin mat yüzeyinde toplandıktan sonra kurutulmaya bırakılması.

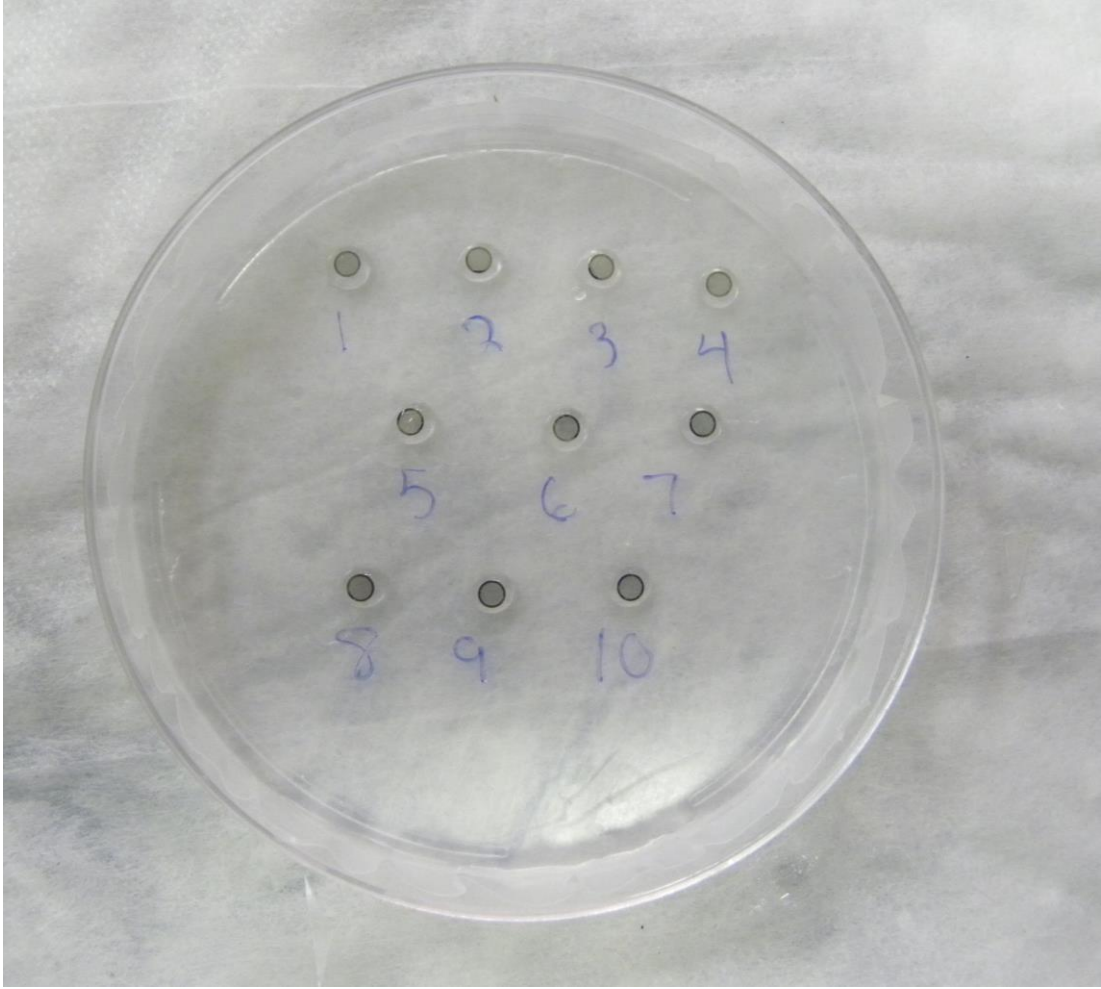
İnce kesitler tuzlu fosfat tamponunda (PBS) 5 dakika (dk) yıkandı. İmmunoglobulinlerin dokulara özgü olmayan bağlanmasını önlemek için primer antikor inkübasyonundan önce kesitler, oda sıcaklığında PBS’de %1 bovin serum albümini (BSA) ve %5 normal keçi serumu (NGS) ile 30 dk. yıkandı. İnce kesitler %1 BSA ve %5 NGS ile çeşitli oranlarda seyreltilmiş primer antikor solüsyonlarıyla 4°C’de ağzı kapalı nemli bir kaptaki bir gece boyunca inkübe edildi. Primer antikorların seyreltilme oranı deneme yanılma yoluyla belirlendi. Farklı oranlarda solüsyonlar hazırlanarak TEM’de incelenerek en fazla immunogold işaretlenme reaksiyonu gösteren karışım oranı seçildi.

Kullanılan proteinler ve karışım oranları Tablo 3.2’de gösterilmiştir. Bu çalışmada sinir büyüme faktörü (NGF), submandibular bez protein C (SMG-C), prolinden zengin protein (PRP), cAMP bağımlı protein kinaz II’nin düzenleyici alt birimi (RII), epidermal büyüme faktörü (EGF), parotis sekresyon proteini (PSP), tükürükteki androjen bağlayıcı protein α (SABP α), müsin (MUC19), yarım ay hücrelerinden salgılanan parotis proteini (DCPP) kullanıldı.

Tablo 3.2. İmmunohistokimya işlemi için kullanılan antikorlar.

Protein	Karışım Oranı	Deneyin Yapıldığı Tükürük Bezi
NGF	1:40	Submandibuler
SMG-C	1:500	Submandibuler
PRP	1:50, 1:200	Submandibuler
EGF	1:25	Submandibuler
SABP α	1:40	Submandibuler
RII	1:100	Sublingual
PSP	1:150	Sublingual
MUC19	1:15	Sublingual
DCPP	1:150	Sublingual

İnkübasyon işlemleri sırasında gridler, parafin filmle kaplı plastik petri kaplarına damlatılan 25-30 μ l'lik solüsyon damlalarında ince kesitlerin bulunduğu yüzeyleri altta olacak şekilde yüzdürüldü (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Gridlerin antikor solüsyonlarıyla inkübasyonu işlemi.

İmmünogold işaretleme işleminin özgüllüğünü test etmek için kontrol gruplarından herhangi biri primer antikordan yoksun %1 BSA ve %5 NGS ile inkübe edildi. İnkübasyon işlemleri arasındaki yıkamalar ise dikdörtgen porselen kapların çukur kısımlarına doldurulan solüsyonlarda, gridlerin ince kesitlerin bulunduğu yüzeyleri altta olacak şekilde yüzdürülmesi ile gerçekleştirildi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Gridlerin İnkübasyon işlemi sonrası porselen kaplarda yıkanması.

Kesitler beşer dakikadan üç kez PBS ile yıkandıktan sonra, oda sıcaklığında PBS'de %1 BSA ile 10 dk. yıkandı. Daha sonra gridler 15 nm altınla işaretli keçi anti- tavşan IgG (Amersham International, Little Chalfont, Bucks., UK) ile 1/20 oranında hazırlanmış %1 BSA'de oda sıcaklığında 60 dk. inkübe edildi. Tekrar her biri 5 dk. süren üç kez PBS ve üç kez de distile suda yıkama işlemi yapıldı. Son olarak; gridler distile suyla dolu kaplara art arda hızlıca sokulup çıkarılarak, forseps ile grid arasında kalan solüsyon artıkları tamamen temizlenip filtre kağıdı ile kaplı petri kabında kurumaya bırakıldı.

Kesitlerin kontrastını arttırmak için ağır metal solüsyonları ile boyanma yapıldı. Bu işlem gridlerin kuruması beklendikten sonra yapıldı. Kuruyan gridler, parafinle kaplı petri kabında %3 uranil asetat damlalarında kesit taşıyan yüzeyleri altta olacak şekilde 3 dk. yüzdürüldükten sonra distile suyla yıkanıp yeniden kurutuldu. Ardından kurşun sitrat solüsyonu ile aynı boyama işlemi tekrarlanıp distile suyla yıkanıp kurumaya bırakıldı. CO₂'in kurşun sitrat solüsyonu tarafından

emilmesi sonucu oluşan çözünmeyen kurşun karbonatın kesitlerde artifakta neden olabileceği düşünülerek, bu artifaktı önlemek üzere kurşun sitratla boyama sırasında petri kabına sodyum tuzları ilave edilerek ortamdaki CO₂'in emilimi sağlandı. Bu şekilde kontrastlanması tamamlanan ince kesitleri taşıyan gridler, TEM'de incelenerek fotoğraflandı.

Hücre içi protein konsantrasyonu ve dağılımını belirlemek için TEM ekranında altın partiküllerinin görüntülenemediği düşük büyütmelerde (x1000) fotoğraflama yapıldı. En az 6 farklı bölgeden seçilen hücrelerden x10000 büyütmede de görüntü alındı ve elde edilen negatifler 1200 piksel/ inç çözünürlükte taranarak Adobe Photoshop programına aktarıldı.

Hücre bölmelerindeki (sekresyon granülleri, golgi, granüllü endoplazmik retikulum, sitoplazma, çekirdek) immunogold işaretlenme densitesi görüntü üstüne konan her bir kenarı 0.5 µm olan gridlerin kesişme noktaları sayılarak hesaplandı. Her bir µm² 'lik alan 4 adet gridden oluştuğu için ilgili bölme üzerindeki kesişme noktaları sayılıp dört ile bölünerek µm² cinsinden alan hesabı yapıldı. Tekrar ilgili bölme üzerindeki altın partikülleri sayılıp bölme alanına bölünerek altın partikülleri/µm² bulundu.

Her bir bölmeden elde edilen veriler Microsoft Excel programındaki istatistiksel hesaplar aracılığıyla ortalama altın partikülleri/µm² ± Standart Sapma olarak ifade edildi.

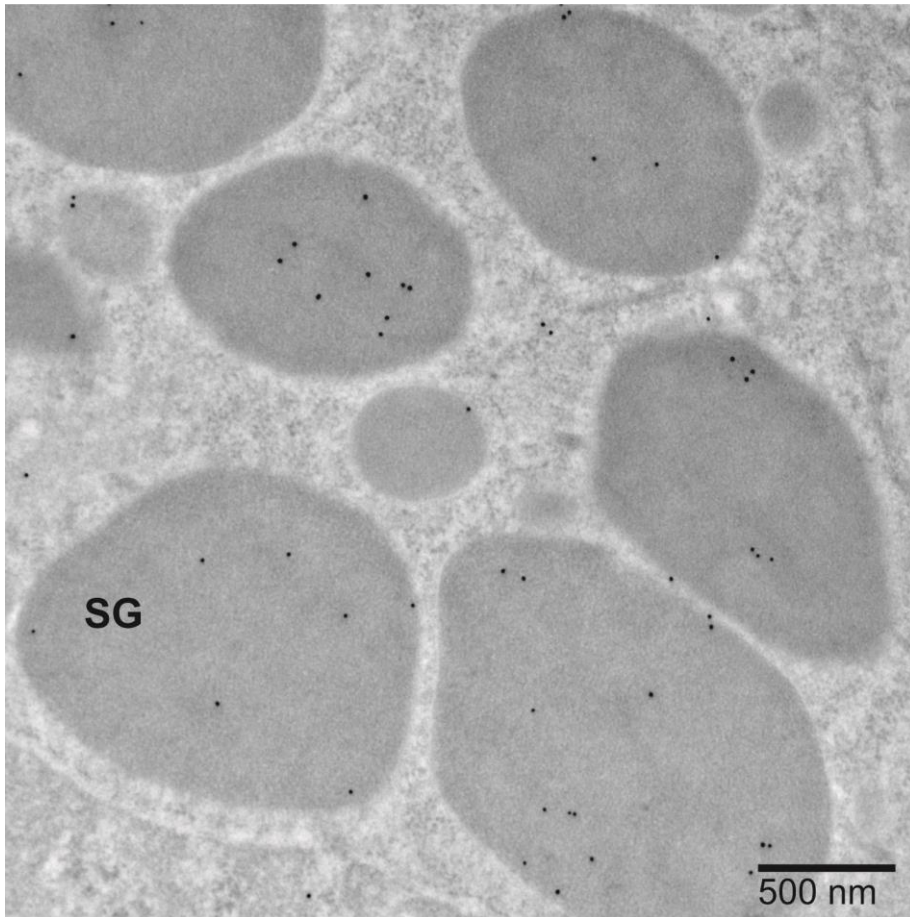
Verilerin değerlendirilmesinde Hiyerarşik Doğrusal Model Analizi kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 (p <0.05) olarak alındı.

4. BULGULAR

Bu çalışmada elde edilen bulgular, Hiyerarşik Doğrusal Model Analizi ile her bir protein için öncelikle farelerden alınan örnek sayısı (n= 26-108) ve daha sonra da fare sayısı (n=2-4) esas alınarak iki aşamada analiz edilmiştir. Uçuş deney grubundaki 2 adet fareden alınan sublingual tükürük bezi örnekleri, fiksasyonları yetersiz olduğu için çalışmaya dahil edilmemiştir. Her iki aşamanın da sonuçları her bir proteine özgü olarak tablolar ve şekillerle aşağıdaki gibi ifade edilmiştir.

NGF (Sinir Büyüme Faktörü) Proteini

Anti-NGF antikoruna ile işaretli kesitlerde altın partikülleri submandibuler tükürük bezi asinus hücrelerinin sekresyon granüllerinde saptanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Submandibuler tükürük bezi asinus hücreleri sekresyon granüllerinin (SG) anti-NGF antikoruna ile immunogold işaretlenmesinin elektron mikroskobu görüntüsü.

Analiz biriminin, farelerden alınan örnek sayısı olarak belirlendiği ilk aşama sonuçları Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. NGF proteininin submandibuler bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu.

Organel	Altın partikülleri / $\mu\text{m}^2 \pm$ Standart Sapma (n)	
	Uçuş Grubu	Yeryüzü Kontrol Grubu
Sekresyon Granülleri	3.16 \pm 1.24 (40)	4.22 \pm 1.82 (40)
Çekirdek	0.93 \pm 0.55 (20)	1.20 \pm 0.49 (20)

Tablo 4.1’de belirtilen sayısal analiz sonuçlarına göre uçuş deney grubundaki sekresyon granüllerinin NGF proteini ile immunogold işaretlenme yoğunluğu, yeryüzü kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0.006). Çekirdekteki altın partikülleri yoğunluğu ise primer antikora işaretlenmeyen immunohistokimyasal kontrol grubu işaretlenme yoğunluğu ile benzer seviyededir. Bu durum çekirdekteki immunogold işaretlenmenin özgül olmayan bağlanma olduğunu göstermektedir.

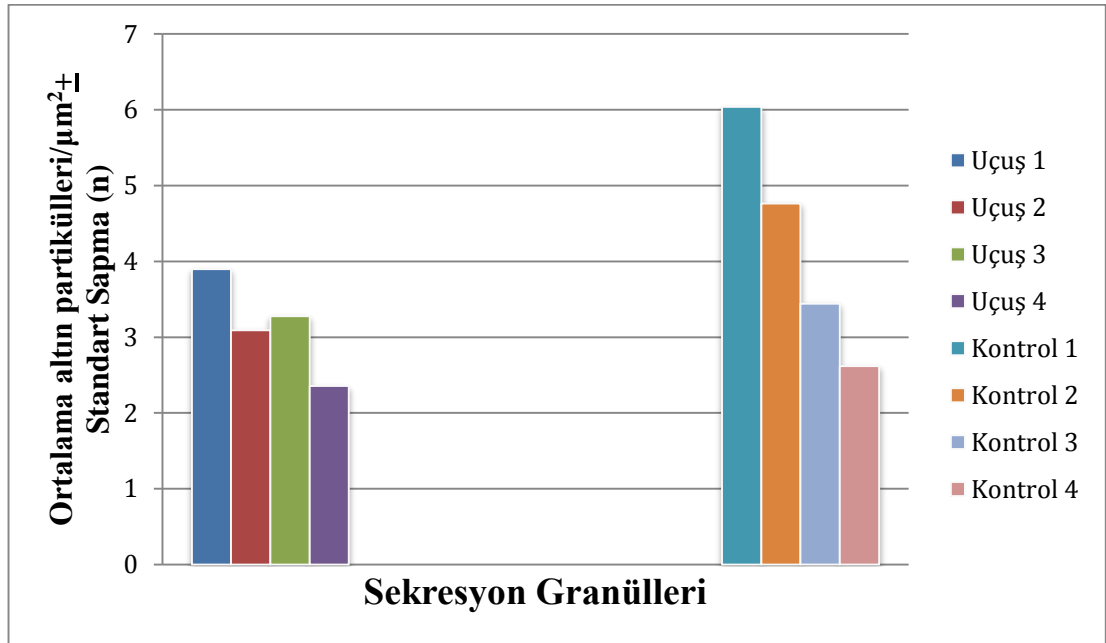
Fare sayısının esas alındığı, ikinci aşama istatistiksel analizlerin sonucu ise Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. NGF proteininin submandibuler bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu.

Organel	Altın partikülleri / $\mu\text{m}^2 \pm$ Standart Sapma (n)	
	Uçuş Grubu	Yeryüzü Kontrol Grubu
Sekresyon Granülleri	3.16 \pm 0.63 (4)	4.22 \pm 1.50 (4)
Çekirdek	0.93 \pm 0.38 (4)	1.20 \pm 0.19 (4)

Örnek sayısının (n=4) ilk aşama analizlerine göre daha az olduğu ikinci aşama sonuçlarında da ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğunun uçuş deney grubunda yeryüzü kontrol grubuna göre düşük olduğu saptanmıştır, ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0.20).

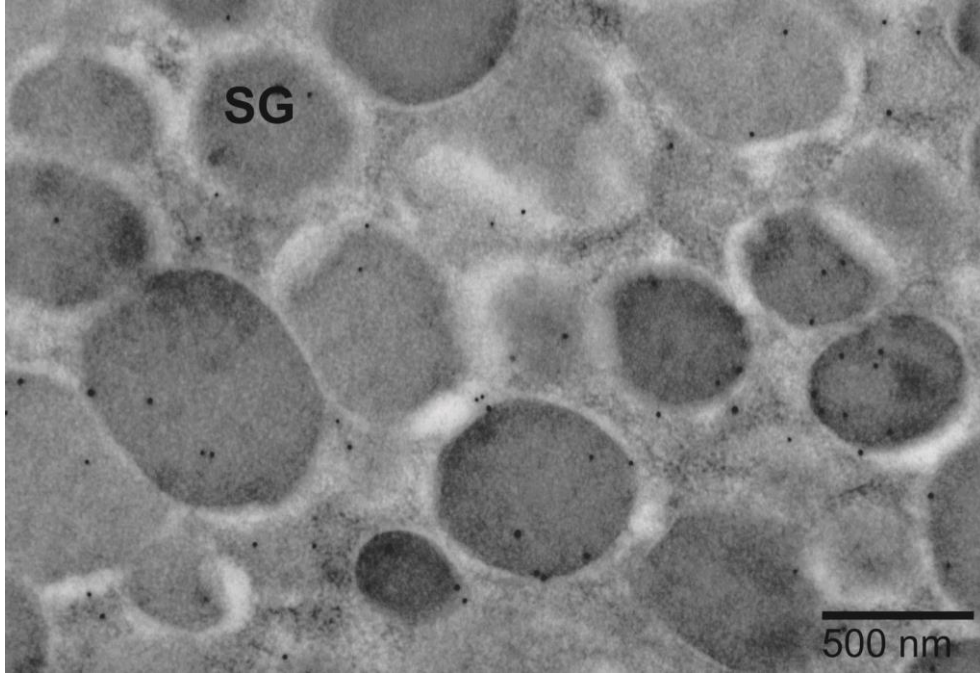
Ayrıca yeryüzü kontrol grubundaki farelerin her birinin sekresyon granülleri ortalama işaretlenme yoğunluğu yönünden oldukça farklı değerler göstermektedir. En düşük ve en yüksek ortalama işaretlenme yoğunluğu arasındaki fark iki kattan fazladır. Uçuş deney grubundaki fareler ise sekresyon granülleri ortalama işaretlenme yoğunluğu açısından benzer değerler göstermektedir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. NGF proteininin uçuş ve yeryüzü kontrol grubu farelerinde ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğu dağılımı.

SMG-C (Submandibuler Tükürük Bezi Protein C)

Anti-SMG-C antikoru ile işaretli kesitlerde altın partikülleri submandibuler tükürük bezi terminal tübül hücreleri sekresyon granüllerinde saptanmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Submandibuler tükürük bezi terminal tübül hücreleri sekresyon granüllerinin (SG) anti-SMG-C antikoru ile immunogold işaretlenmesinin elektron mikroskobu görüntüsü.

Analiz biriminin, farelerden alınan örnek sayısı olarak belirlendiği ilk aşama sonuçları Tablo 4.3'te sunulmaktadır.

Tablo 4.3. SMG-C proteininin submandibuler bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu.

Organel	Altın partikülleri / $\mu\text{m}^2 \pm$ Standart Sapma (n)	
	Uçuş Grubu	Yeryüzü Kontrol Grubu
Sekresyon Granülleri	8.89 ± 2.68 (21)	12.70 ± 4.59 (28)
Çekirdek	3.75 ± 2.87 (10)	2.51 ± 3.14 (16)

Tablo 4.3'te belirtilen sayısal analiz sonuçlarına göre, uçuş deney grubundaki sekresyon granüllerinin SMG-C proteini ile immunogold işaretlenme yoğunluğu, yeryüzü kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.001$). Çekirdekteki altın partikülleri yoğunluğu ise primer antikorla işaretlenmeyen immunohistokimyasal kontrol grubu işaretlenme yoğunluğu ile benzer seviyededir. Bu durum çekirdekteki immunogold işaretlenmenin özgül olmayan bağlanma olduğunu göstermektedir.

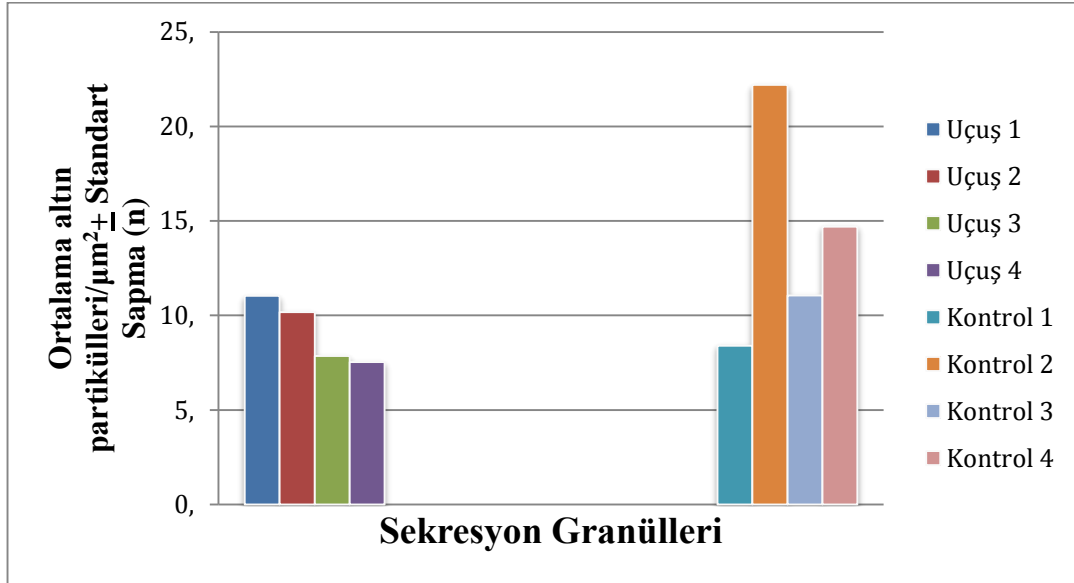
Fare sayısının esas alındığı ikinci aşama istatistiksel analizlerin sonucu ise Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4. SMG-C proteininin submandibuler bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu.

Organel	Altın partikülleri / $\mu\text{m}^2 \pm$ Standart Sapma (n)	
	Uçuş Grubu	Yeryüzü Kontrol Grubu
Sekresyon Granülleri	9.15 \pm 1.72 (4)	14.09 \pm 5.99 (4)
Çekirdek	3.11 \pm 1.30 (4)	2.39 \pm 1.81 (4)

Örnek sayısının (n=4) ilk aşama analizlerine göre çok daha düşük olduğu ikinci aşama sonuçlarında da ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğunun uçuş deney grubunda yeryüzü kontrol grubuna göre düşük olduğu saptanmıştır, ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.087$).

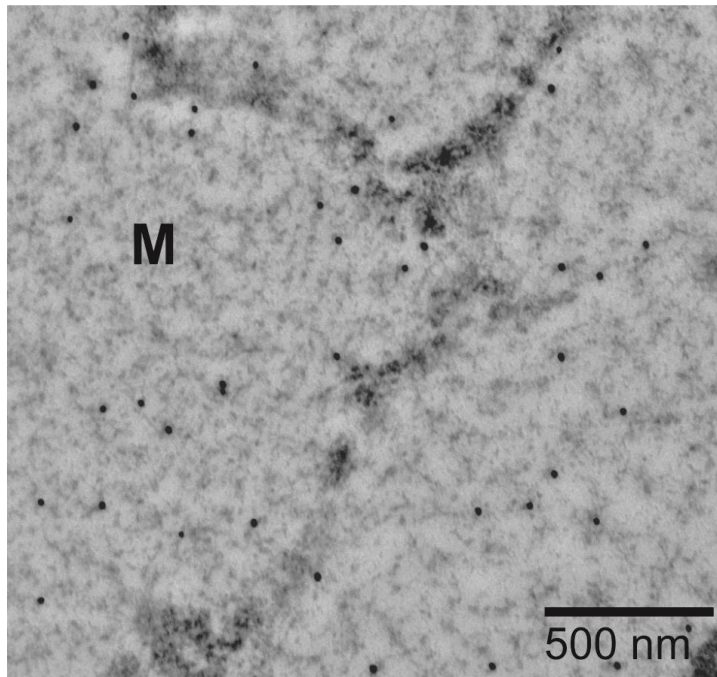
Ayrıca, yeryüzü kontrol grubundaki farelerin her birinin sekresyon granülleri ortalama işaretlenme yoğunluğu açısından oldukça farklı değerler göstermektedir. En yüksek ortalama işaretlenme yoğunluğu, en düşük işaretlenme yoğunluğunun yaklaşık üç katı kadardır. Uçuş deney grubundaki fareler ise sekresyon granülleri ortalama işaretlenme yoğunluğu açısından benzer değerler göstermektedir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. SMG-C proteininin uçuş ve yeryüzü kontrol grubu farelerinde ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğu dağılımı.

PRP (Prolinden Zengin Protein)

Anti-PRP antikoruna ile işaretli kesitlerde altın partikülleri submandibuler tükürük bezi müköz hücrelerinde saptanmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Submandibuler tükürük bezi müköz hücrelerinin (M) anti-PRP antikoruna ile immunogold işaretlenmesinin elektron mikroskobu görüntüsü.

Analiz biriminin farelerden alınan örnek sayısı olarak belirlendiği ilk aşama sonuçları Tablo 4.5'te sunulmaktadır.

Tablo 4.5. PRP proteininin submandibuler bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu.

Organel	Altın partikülleri / $\mu\text{m}^2 \pm$ Standart Sapma (n)	
	Uçuş Grubu	Yeryüzü Kontrol Grubu
Sekresyon Granülleri	7.84 \pm 2.17 (40)	7.32 \pm 2.13 (40)
Çekirdek	0.65 \pm 0.53 (20)	0.73 \pm 0.37 (20)

Tablo 4.5'te belirtilen sayısal analiz sonuçlarına göre uçuş deney grubundaki sekresyon granüllerinin PRP ile immunogold işaretlenme yoğunluğu yeryüzü kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur, ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.25$). Çekirdekteki altın partikülleri yoğunluğu ise primer antikora işaretlenmeyen immunohistokimyasal kontrol grubu işaretlenme yoğunluğu ile benzer seviyededir. Bu durum çekirdekteki immunogold işaretlenmenin özgül olmayan bağlanma olduğunu göstermektedir.

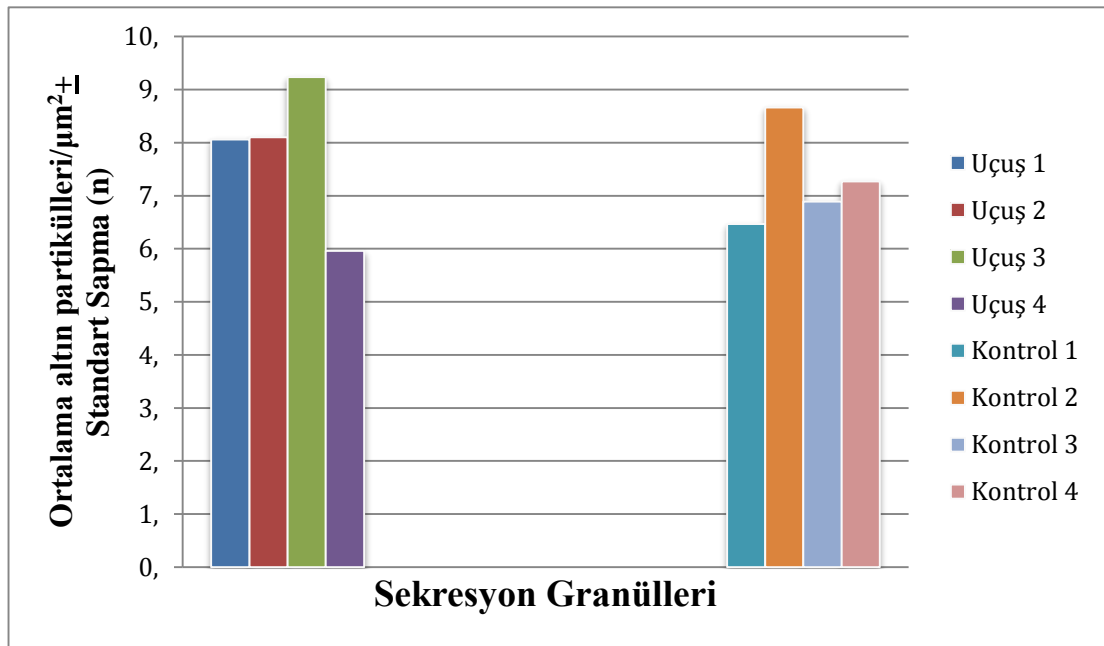
Fare sayısının esas alındığı ikinci aşama istatistiksel analizlerin sonucu ise Tablo 4.6'da gösterilmiştir

Tablo 4.6. PRP proteininin submandibuler bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu.

Organel	Altın partikülleri / $\mu\text{m}^2 \pm$ Standart Sapma (n)	
	Uçuş Grubu	Yeryüzü Kontrol Grubu
Sekresyon Granülleri	7.84 \pm 1.37 (4)	7.36 \pm 0.88 (4)
Çekirdek	0.65 \pm 0.27 (4)	0.73 \pm 0.20 (4)

Örnek sayısının (n=4) ilk aşama analizlerine göre çok daha düşük olduğu ikinci aşama sonuçlarında da ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğunun uçuş deney grubunda yeryüzü kontrol grubuna göre yüksek olduğu saptanmıştır, ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0.47).

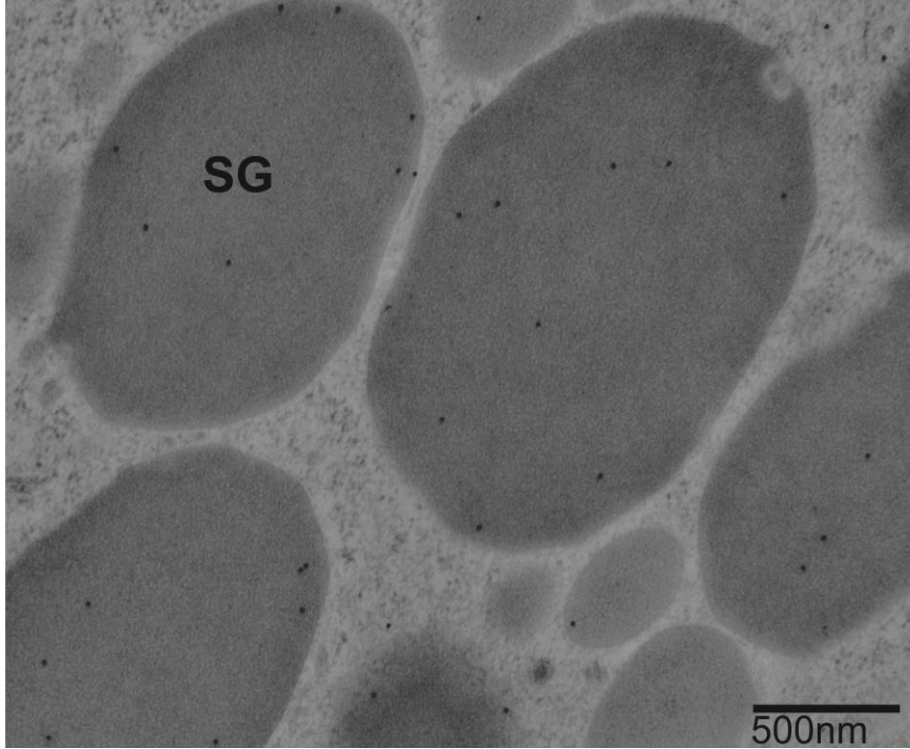
Ayrıca, yeryüzü kontrol grubundaki farelerin her birinin sekresyon granülleri ortalama işaretlenme yoğunluğu açısından benzer değerler göstermektedir. Uçuş grubundaki fareler de aynı şekilde sekresyon granülleri ortalama işaretlenme yoğunluğu açısından benzer değerler göstermektedir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. PRP proteininin uçuş ve yeryüzü kontrol grubu farelerinde ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğu dağılımı.

EGF (Epidermal Büyüme Faktörü) Proteini

Anti-EGF antikoru ile işaretli kesitlerde altın partikülleri submandibuler tükürük bezi asinus hücrelerinin sekresyon granüllerinde saptanmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Submandibuler tükürük bezi asinus hücreleri sekresyon granüllerinin (SG) anti-EGF antikoruna ile immunogold işaretlenmesinin elektron mikroskobu görüntüsü.

Analiz biriminin, farelerden alınan örnek sayısı olarak belirlendiği ilk aşama sonuçları Tablo 4.7’de sunulmaktadır.

Tablo 4.7. EGF proteininin submandibuler bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu.

Organel	Altın partikülleri / $\mu\text{m}^2 \pm$ Standart Sapma (n)	
	Uçuş Grubu	Yeryüzü Kontrol Grubu
Sekresyon Granülleri	3.72 ± 3.14 (40)	3.41 ± 3.22 (40)
Çekirdek	0.49 ± 0.81 (20)	0.76 ± 1.02 (20)

Tablo 4.7’de belirtilen sayısal analiz sonuçlarına göre, uçuş deney grubundaki sekresyon granüllerinin EGF ile immunogold işaretlenme yoğunluğu yeryüzü kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur, ancak bu farklılık istatistiksel

olarak anlamlı değildir ($p=0.50$). Çekirdekdeki altın partikülleri yoğunluğu ise primer antikorla işaretlenmeyen immunohistokimyasal kontrol grubu işaretlenme yoğunluğu ile benzer seviyededir. Bu durum çekirdekdeki immunogold işaretlenmenin özgül olmayan bağlanma olduğunu göstermektedir.

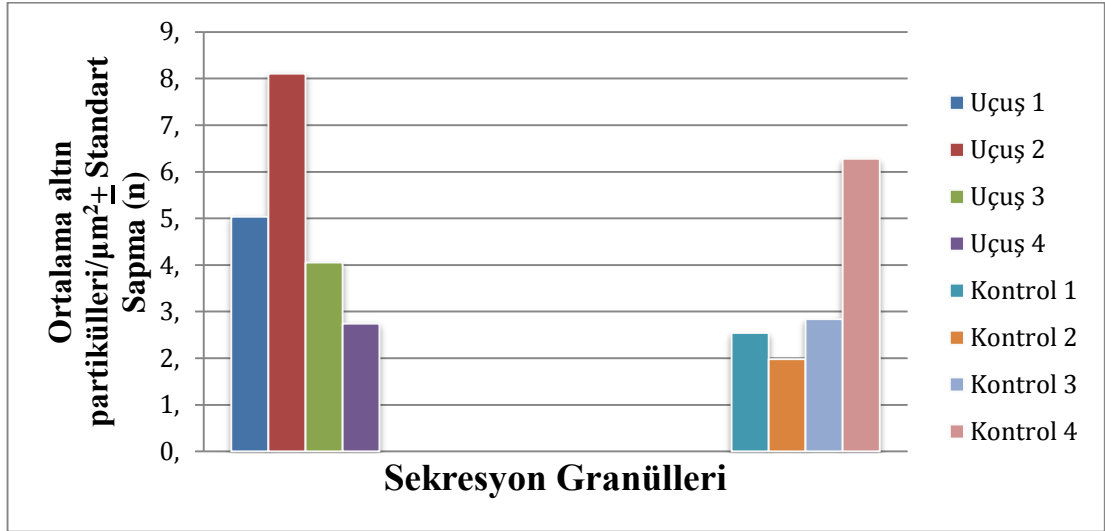
Fare sayısının esas alındığı ikinci aşama istatistiksel analizlerin sonucu ise tablo 4.8’de gösterilmiştir.

Tablo 4.8. EGF proteininin submandibuler bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu.

Organel	Altın partikülleri / $\mu\text{m}^2 \pm$ Standart Sapma (n)	
	Uçuş Grubu	Yeryüzü Kontrol Grubu
Sekresyon Granülleri	3.72 \pm 1.04 (4)	3.41 \pm 1.94 (4)
Çekirdek	0.49 \pm 0.36 (4)	0.76 \pm 0.25 (4)

Örnek sayısının ($n=4$) ilk aşama analizlerine göre çok daha düşük olduğu ikinci aşama sonuçlarında da ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğunun uçuş deney grubunda yeryüzü kontrol grubuna göre yüksek olduğu saptanmıştır, ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.64$).

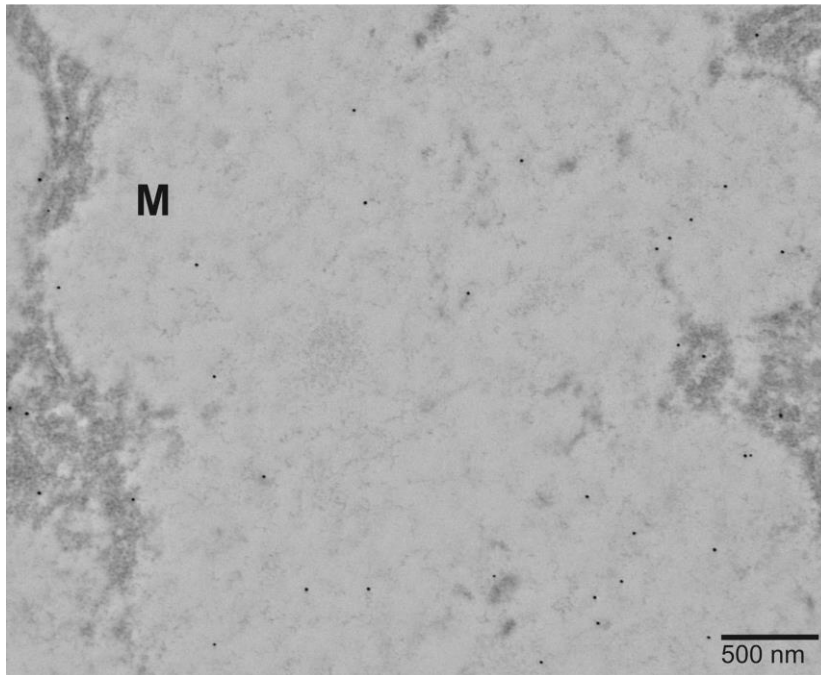
Ayrıca, yeryüzü kontrol grubundaki farelerin her birinin sekresyon granülleri ortalama işaretlenme yoğunluğu açısından benzer değerler gösterirken sadece 4 numaralı kontrol grubu faresinin işaretlenme yoğunluğu diğerlerinin yaklaşık üç katı kadardır. Uçuş deney grubundaki farelerinde de sekresyon granülleri ortalama işaretlenme yoğunluğu açısından birbirinden farklı değerler göstermektedir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. EGF proteininin uçuş ve yeryüzü kontrol grubu farelerinde ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğu dağılımı.

SABP α (Tükürükteki Androjen Bağlayıcı Protein)

Anti-SABP α antikoruna ile işaretli kesitlerde altın partikülleri submandibuler tükürük bezi müköz hücrelerinde saptanmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Submandibuler tükürük bezi müköz hücrelerinin (M) anti-SABP α antikoruna ile immunogold işaretlenmesinin elektron mikroskobu görüntüsü.

Analiz biriminin farelerden alınan örnek sayısı olarak belirlendiği ilk aşama sonuçları Tablo 4.9’da sunulmaktadır.

Tablo 4.9. SABP α proteininin submandibuler bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu.

Organel	Altın partikülleri / $\mu\text{m}^2 \pm$ Standart Sapma (n)	
	Uçuş Grubu	Yeryüzü Kontrol Grubu
Sekresyon Granülleri	1.59 \pm 0.63 (40)	1.25 \pm 0.53 (40)
Çekirdek	0.65 \pm 0.6 (20)	0.28 \pm 0.22 (20)

Tablo 4.9’da belirtilen sayısal analiz sonuçlarına göre uçuş deney grubundaki sekresyon granüllerinin SABP α ile immunogold işaretlenme yoğunluğu yeryüzü kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır (p=.011). Çekirdekteki altın partikülleri yoğunluğu ise primer antikorla işaretlenmeyen immunohistokimyasal kontrol grubu işaretlenme yoğunluğu ile benzer seviyededir. Bu durum çekirdekteki immunogold işaretlenmenin özgül olmayan bağlanma olduğunu göstermektedir.

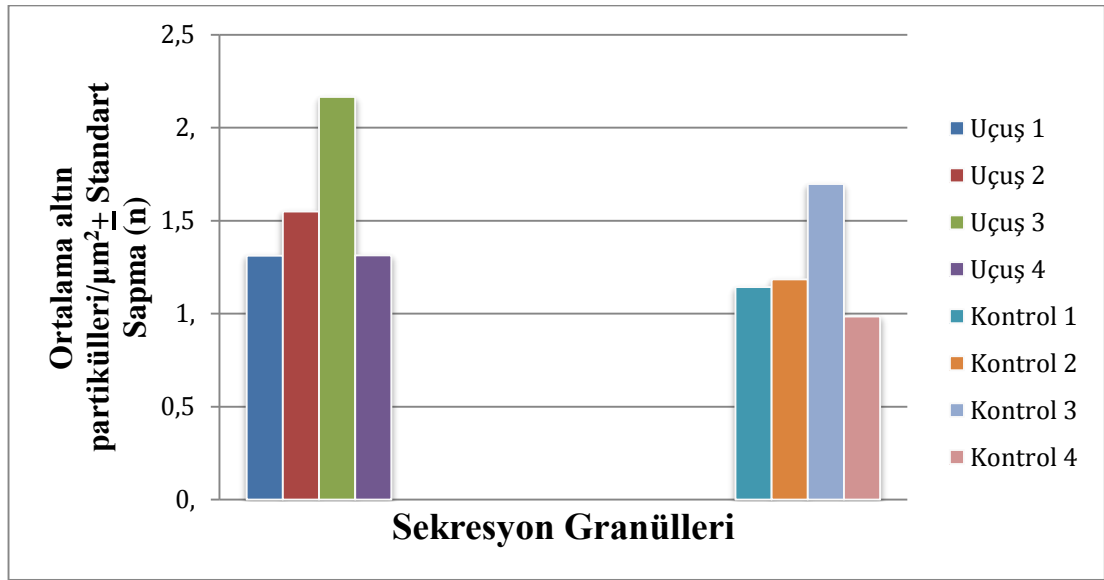
Fare sayısının esas alındığı ikinci aşama istatistiksel analizlerin sonucu ise tablo 4.10’da gösterilmiştir.

Tablo 4.10. SABP α proteininin submandibuler bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu.

Organel	Altın partikülleri / $\mu\text{m}^2 \pm$ Standart Sapma (n)	
	Uçuş Grubu	Yeryüzü Kontrol Grubu
Sekresyon Granülleri	1.59 \pm 0.40 (4)	1.25 \pm 0.31 (4)
Çekirdek	0.65 \pm 0.47 (4)	0.28 \pm 0.11 (4)

Örnek sayısının (n=4) ilk aşama analizlerine göre çok daha düşük olduğu ikinci aşama sonuçlarında da ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğunun uçuş deney grubunda yeryüzü kontrol grubuna göre yüksek olduğu saptanmıştır, ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0.18).

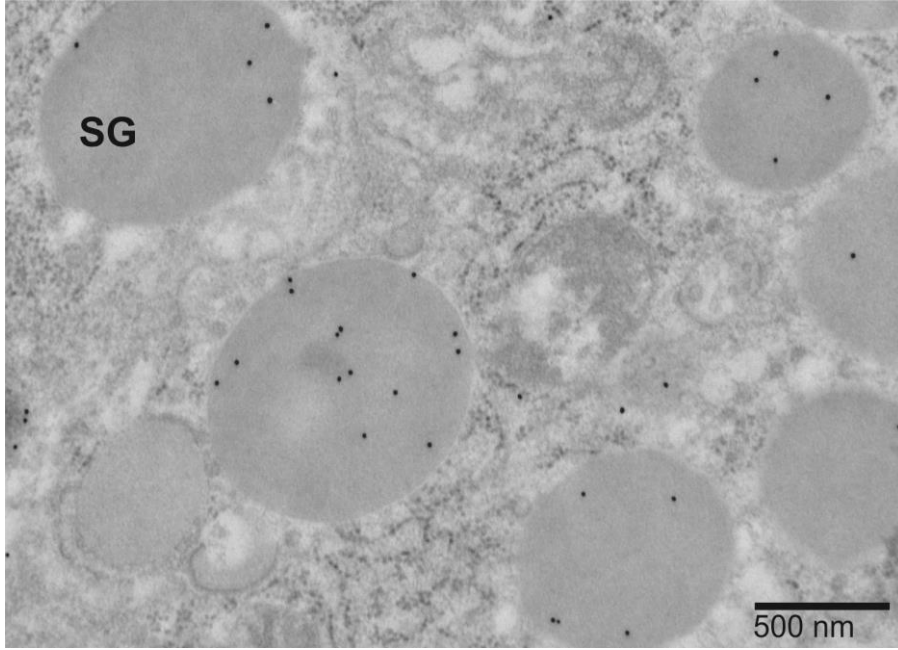
Ayrıca, yeryüzü kontrol grubundaki farelerin her birinin müköz hücreleri ortalama işaretlenme yoğunluğu açısından benzer değerler göstermektedir. Uçuş deney grubundaki fareler de aynı şekilde sekresyon granülleri ortalama işaretlenme yoğunluğu açısından benzer değerler göstermektedir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. SABPα proteininin uçuş ve yeryüzü kontrol grubu farelerinde ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğu dağılımı.

PSP (Parotis Sekresyon Proteini)

Anti-PSP antikoru ile işaretli kesitlerde altın partikülleri sublingual tükürük bezi sekresyon granüllerinde saptanmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Sublingual tükürük bezi sekresyon granüllerinin (SG) anti-PSP antikoruna ile immunogold işaretlenmesinin elektron mikroskobu görüntüsü.

Analiz biriminin farelerden alınan örnek sayısı olarak belirlendiği ilk aşama sonuçları Tablo 4.11’de sunulmaktadır.

Tablo 4.11. PSP proteininin sublingual bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu.

Organel	Altın partikülleri / $\mu\text{m}^2 \pm$ Standart Sapma (n)	
	Uçuş Grubu	Yeryüzü Kontrol Grubu
Sekresyon Granülleri	17.38 \pm 11.15 (20)	13.94 \pm 12.09 (40)
Çekirdek	0.81 \pm 0.53 (10)	0.47 \pm 0.42 (20)

Tablo 4.11’de belirtilen sayısal analiz sonuçlarına göre uçuş deney grubundaki sekresyon granüllerinin PSP ile immunogold işaretlenme yoğunluğu yeryüzü kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur, bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.12$). Çekirdekteki altın partikülleri yoğunluğu ise primer antikorla işaretlenmeyen immunohistokimyasal kontrol grubu işaretlenme yoğunluğu ile

benzer seviyededir. Bu durum çekirdekteki immunogold işaretlenmenin özgül olmayan bağlanma olduğunu göstermektedir.

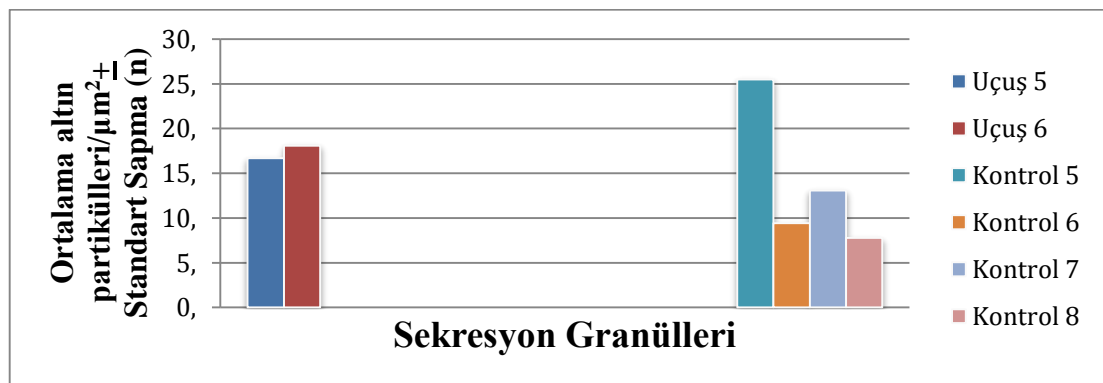
Fare sayısının esas alındığı ikinci aşama istatistiksel analizlerin sonucu ise tablo 4.12’de gösterilmiştir.

Tablo 4.12. PSP proteininin sublingual bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu.

Organel	Altın partikülleri / $\mu\text{m}^2 \pm$ Standart Sapma (n)	
	Uçuş Grubu	Yeryüzü Kontrol Grubu
Sekresyon Granülleri	17.38 \pm 0.97 (2)	13.94 \pm 8.00 (4)
Çekirdek	0.81 \pm 0.16 (2)	0.47 \pm 0.39 (4)

Örnek sayısının (n=2-4) ilk aşama analizlerine göre çok daha düşük olduğu ikinci aşama sonuçlarında da ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğunun uçuş deney grubunda yeryüzü kontrol grubuna göre yüksek olduğu saptanmıştır, ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0.36).

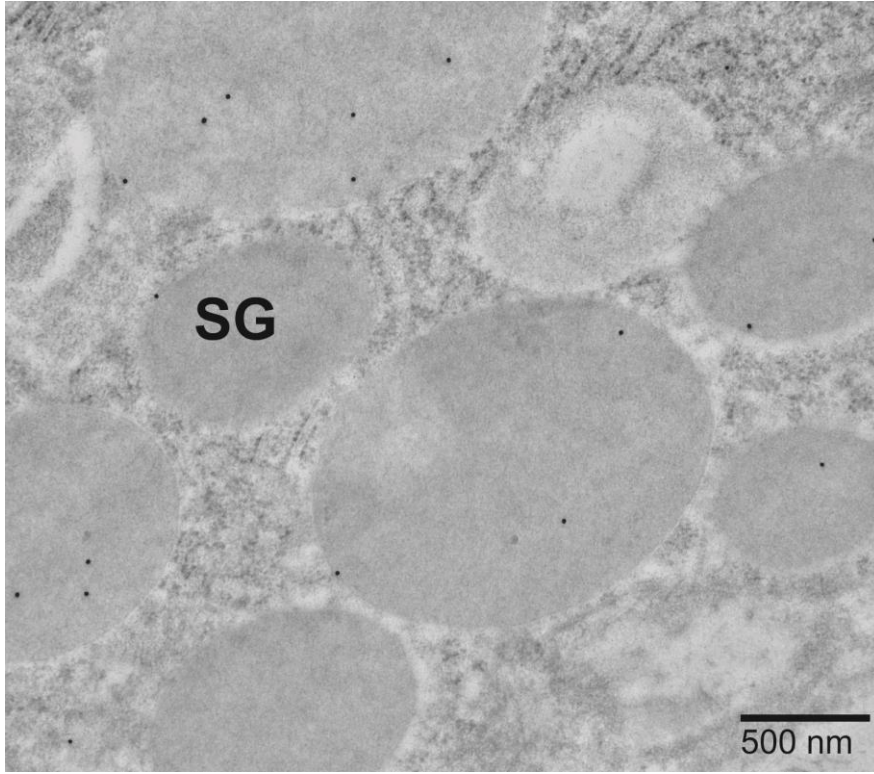
Ayrıca, yeryüzü kontrol grubundaki fareler sekresyon granülleri ortalama işaretlenme yoğunluğu açısından benzer değerler gösterirken sadece 5 numaralı fare diğerlerinden oldukça farklı yüksek bir değer göstermektedir. Uçuş deney grubundaki fareler sekresyon granülleri ortalama işaretlenme yoğunluğu açısından benzer değerler göstermektedir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. PSP proteininin uçuş ve yeryüzü kontrol grubu farelerinde ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğu dağılımı.

RII (Protein Kinaz A'nın Düzenleyici Birimi II)

Anti-RII antikoru ile işaretli kesitlerde altın partikülleri sublingual tükürük bezi sekresyon granüllerinde saptanmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Sublingual tükürük bezi sekresyon granüllerinin (SG) anti-RII antikoru ile immunogold işaretlenmesinin elektron mikroskobu görüntüsü.

Analiz biriminin farelerden alınan örnek sayısı olarak belirlendiği ilk aşama sonuçları Tablo 4.13'te sunulmaktadır.

Tablo 4.13. RII proteininin sublingual bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu.

Organel	Altın partikülleri / $\mu\text{m}^2 \pm$ Standart Sapma (n)	
	Uçuş Grubu	Yeryüzü Kontrol Grubu
Sekresyon Granülleri	4.24 ± 2.58 (39)	1.84 ± 1.98 (69)
Çekirdek	0.08 ± 0.08 (21)	0.10 ± 0.09 (36)

Tablo 4.13'te belirtilen sayısal analiz sonuçlarına göre uçuş deney grubundaki sekresyon granüllerinin RII ile immunogold işaretlenme yoğunluğu yeryüzü kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.001$). Çekirdekteki altın partikülleri yoğunluğu ise primer antikorla işaretlenmeyen immunohistokimyasal kontrol grubu işaretlenme yoğunluğu ile benzer seviyededir. Bu durum çekirdekteki immunogold işaretlenmenin özgül olmayan bağlanma olduğunu göstermektedir.

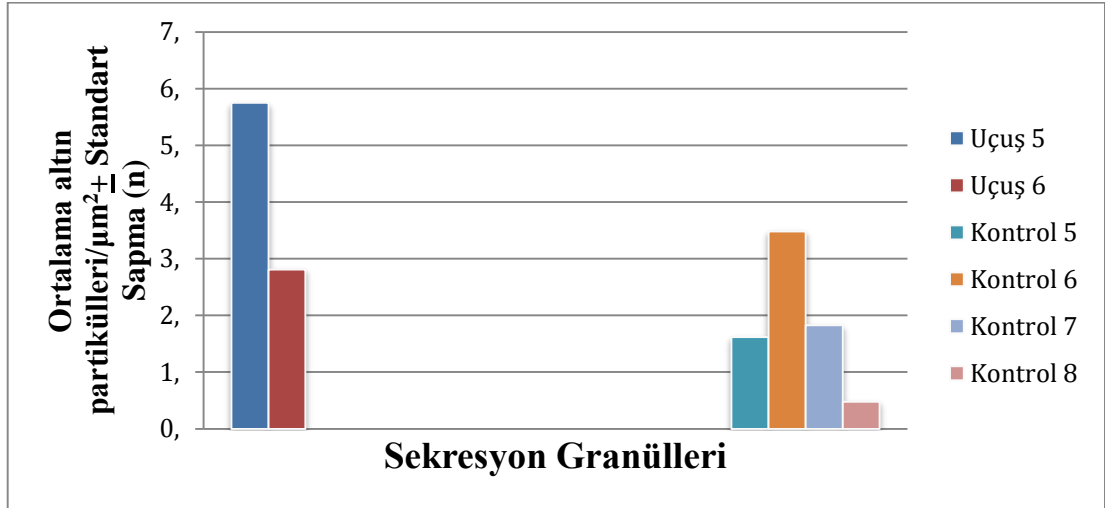
Fare sayısının esas alındığı ikinci aşama istatistiksel analizlerin sonucu ise tablo 4.14'te gösterilmiştir.

Tablo 4.14. RII proteininin sublingual bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu.

Organel	Altın partikülleri / $\mu\text{m}^2 \pm$ Standart Sapma (n)	
	Uçuş Grubu	Yeryüzü Kontrol Grubu
Sekresyon Granülleri	4.28 \pm 2.08 (2)	1.85 \pm 1.24 (4)
Çekirdek	0.08 \pm 0.02 (2)	0.10 \pm 0.07 (4)

Örnek sayısının ($n=2-4$) ilk aşama analizlerine göre çok daha düşük olduğu ikinci aşama sonuçlarında da ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğunun uçuş deney grubunda yeryüzü kontrol grubuna göre yüksek olduğu saptanmıştır, bu sonuç istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.077$).

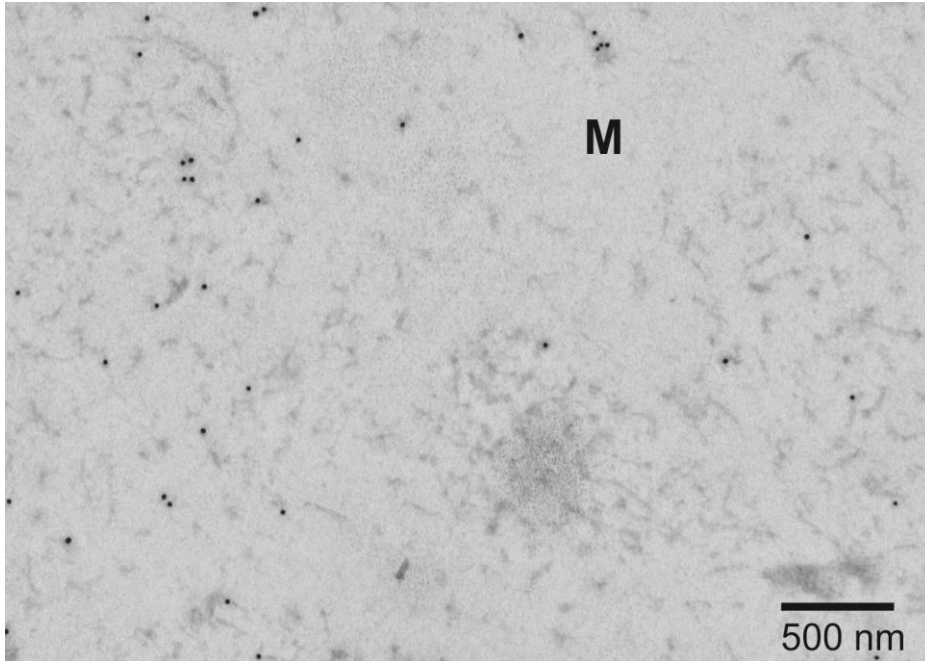
Ayrıca, yeryüzü kontrol grubundaki farelerin her birinin sekresyon granülleri ortalama işaretlenme yoğunluğu açısından birbirinden farklı değerler göstermektedir. Uçuş deney grubundaki fareler sekresyon granülleri ortalama işaretlenme yoğunluğu açısından birbirinin iki katı olacak şekilde farklı değerler göstermektedir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. RII proteininin uçuş ve yeryüzü kontrol grubu farelerinde ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğu dağılımı.

MUC 19 (Müsin 19) Proteini

Anti-Muc 19 antikoru ile işaretli kesitlerde altın partikülleri sublingual tükürük bezi müköz hücrelerinde saptanmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Sublingual tükürük bezi müköz hücrelerinin (M) anti-Muc 19 antikoru ile immunogold işaretlenmesinin elektron mikroskobu görüntüsü.

Analiz biriminin farelerden alınan örnek sayısı olarak belirlendiği ilk aşama sonuçları Tablo 4.15'te sunulmaktadır.

Tablo 4.15. Muc 19 proteininin sublingual bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu.

Organel	Altın partikülleri / $\mu\text{m}^2 \pm$ Standart Sapma (n)	
	Uçuş Grubu	Yeryüzü Kontrol Grubu
Sekresyon Granülleri	0.22 \pm 0.13 (15)	2.00 \pm 1.98 (40)
Çekirdek	0.15 \pm 0.14 (9)	2.05 \pm 2.27 (20)

Tablo 4.15'te belirtilen sayısal analiz sonuçlarına göre uçuş deney grubundaki sekresyon granüllerinin Muc 19 ile immunogold işaretlenme yoğunluğu yeryüzü kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.001$). Çekirdekteki altın partikülleri yoğunluğu ise primer antikorla işaretlenmeyen immunohistokimyasal kontrol grubu işaretlenme yoğunluğu ile benzer seviyededir. Bu durum çekirdekteki immunogold işaretlenmenin özgül olmayan bağlanma olduğunu göstermektedir.

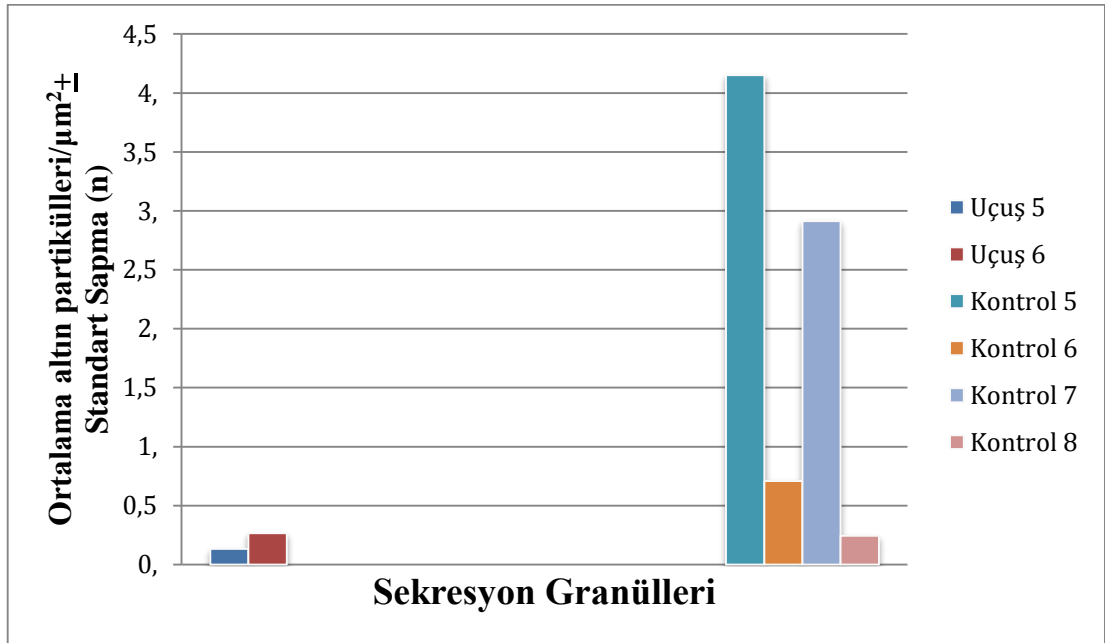
Fare sayısının esas alındığı ikinci aşama istatistiksel analizlerin sonucu ise tablo 4.16'da gösterilmiştir.

Tablo 4.16. Muc 19 proteininin sublingual bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu.

Organel	Altın partikülleri / $\mu\text{m}^2 \pm$ Standart Sapma (n)	
	Uçuş Grubu	Yeryüzü Kontrol Grubu
Sekresyon Granülleri	0.20 \pm 0.09 (2)	2.00 \pm 1.85 (4)
Çekirdek	0.12 \pm 0.08 (2)	2.05 \pm 2.46 (4)

Örnek sayısının (n=2-4) ilk aşama analizlerine göre çok daha düşük olduğu ikinci aşama sonuçlarında da ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğunun uçuş deney grubunda yeryüzü kontrol grubuna göre düşük olduğu saptanmıştır, bu sonuç istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0.14).

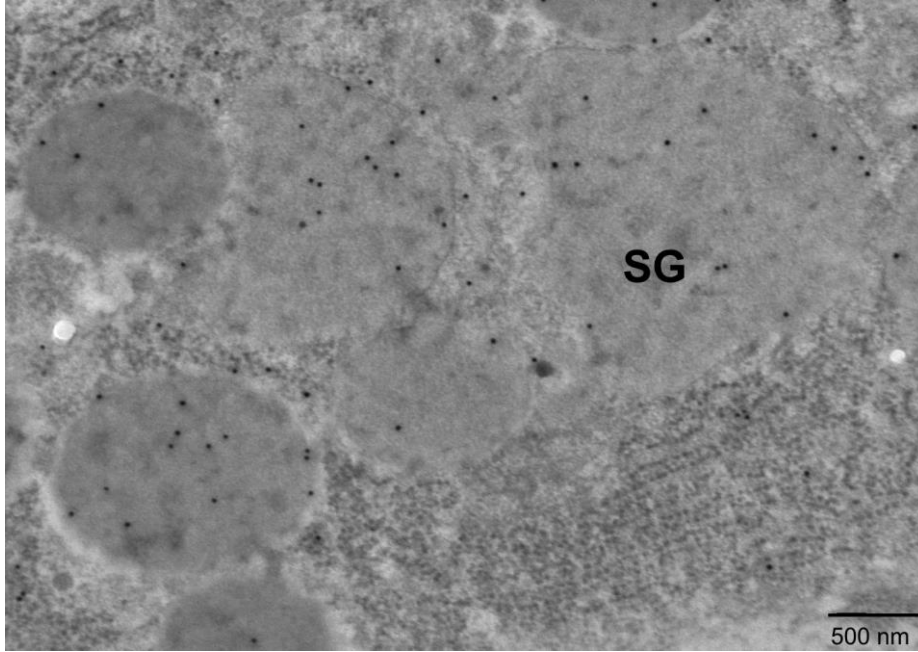
Ayrıca, yeryüzü kontrol grubundaki farelerin her birinin sekresyon granülleri ortalama işaretlenme yoğunluğu açısından birbirinden oldukça farklı değerler göstermektedir. Uçuş deney grubundaki fareler sekresyon granülleri ortalama işaretlenme yoğunluğu açısından benzer, çok düşük değerler göstermektedir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Muc 19 proteininin uçuş ve yeryüzü kontrol grubu farelerinde ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğu dağılımı.

DCPP (Yarım Ay Hücrelerinden Salgılanan Parotis Proteini) Proteini

Anti-DCPP antikoru ile işaretli kesitlerde altın partikülleri sublingual tükürük bezi seröz yarım ay hücrelerinde saptanmıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Sublingual tükürük bezi seröz yarım ay hücresi sekresyon granüllerinin (SG) anti-DCPP antikoru ile immunogold işaretlenmesinin elektron mikroskobu görüntüsü.

Analiz biriminin farelerden alınan örnek sayısı olarak belirlendiği ilk aşama sonuçları Tablo 4.17’de sunulmaktadır.

Tablo 4.17. DCPD proteininin sublingual bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu.

Organel	Altın partikülleri / $\mu\text{m}^2 \pm$ Standart Sapma (n)	
	Uçuş Grubu	Yeryüzü Kontrol Grubu
Sekresyon Granülleri	13.88 \pm 5.14 (19)	16.63 \pm 6.43 (39)
Çekirdek	0.78 \pm 0.8 (11)	0.77 \pm 0.74 (21)

Tablo 4.17’de belirtilen sayısal analiz sonuçlarına göre uçuş deney grubundaki sekresyon granüllerinin DCPD ile immunogold işaretlenme yoğunluğu yeryüzü kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur, bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.10$). Çekirdekteki altın partikülleri yoğunluğu ise primer antikoruyla işaretlenmeyen immunohistokimyasal kontrol grubu işaretlenme yoğunluğu ile

benzer seviyededir. Bu durum çekirdekteki immunogold işaretlenmenin özgül olmayan bağlanma olduğunu göstermektedir.

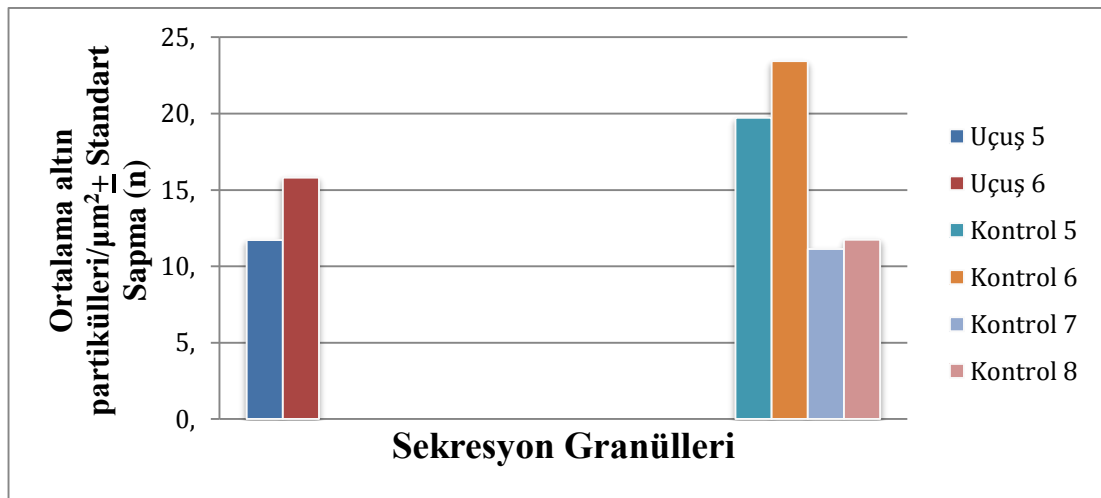
Fare sayısının esas alındığı ikinci aşama istatistiksel analizlerin sonucu ise tablo 4.18’de gösterilmiştir.

Tablo 4.18. DCPD proteininin sublingual bezde immunogold işaretlenme yoğunluğu.

Organel	Altın partikülleri / $\mu\text{m}^2 \pm$ Standart Sapma (n)	
	Uçuş Grubu	Yeryüzü Kontrol Grubu
Sekresyon Granülleri	13.77 \pm 2.89 (2)	16.51 \pm 6.05 (4)
Çekirdek	0.82 \pm 0.65 (2)	0.79 \pm 0.46 (4)

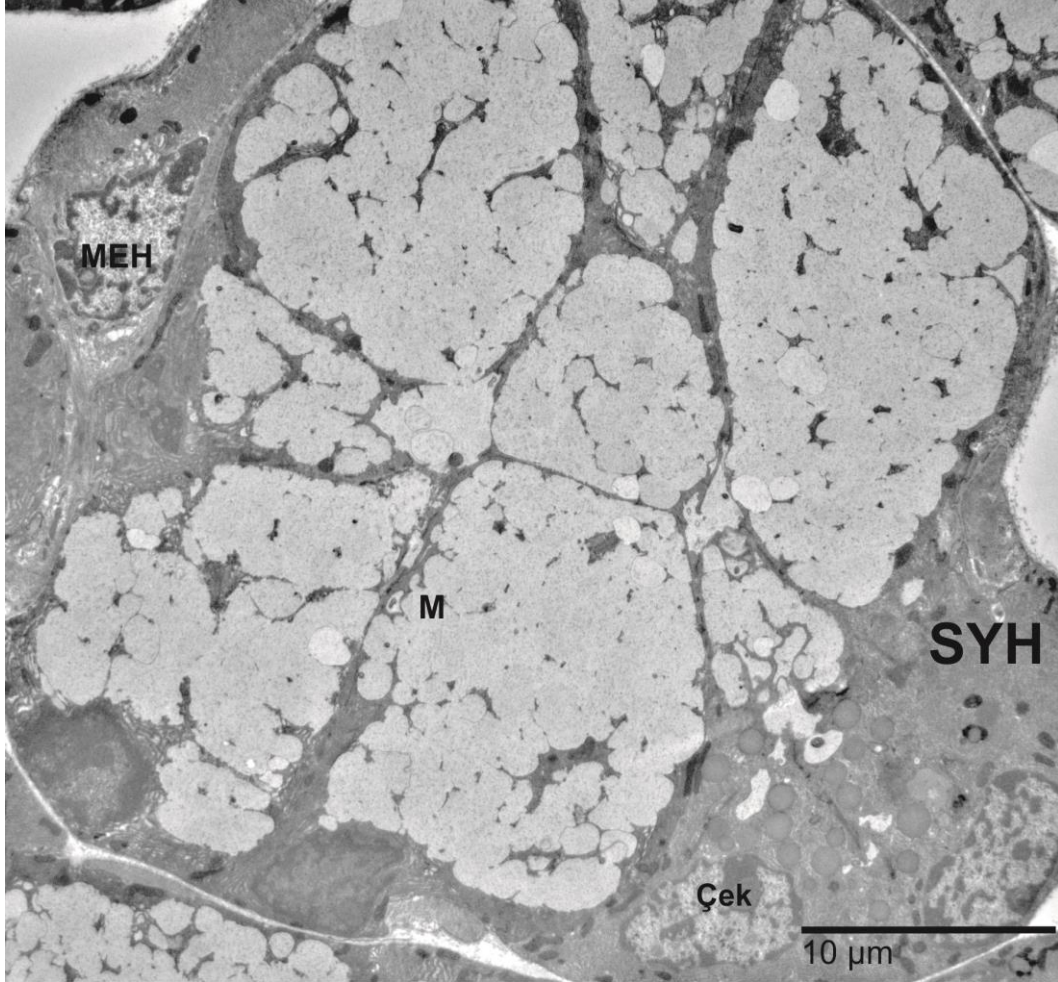
Örnek sayısı (n=2-4) ilk aşama analizlerine göre çok daha düşük olduğu ikinci aşama sonuçlarında da ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğunun uçuş deney grubunda yeryüzü kontrol grubuna göre düşük olduğu saptanmıştır, bu sonuç istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0.52).

Ayrıca yeryüzü kontrol grubundaki farelerin her birinin sekresyon granülleri ortalama işaretlenme yoğunluğu açısından birbirinden farklı değerler göstermektedir. Uçuş deney grubundaki fareler sekresyon granülleri ortalama işaretlenme yoğunluğu açısından benzer değerler göstermektedir (Şekil 4.18).

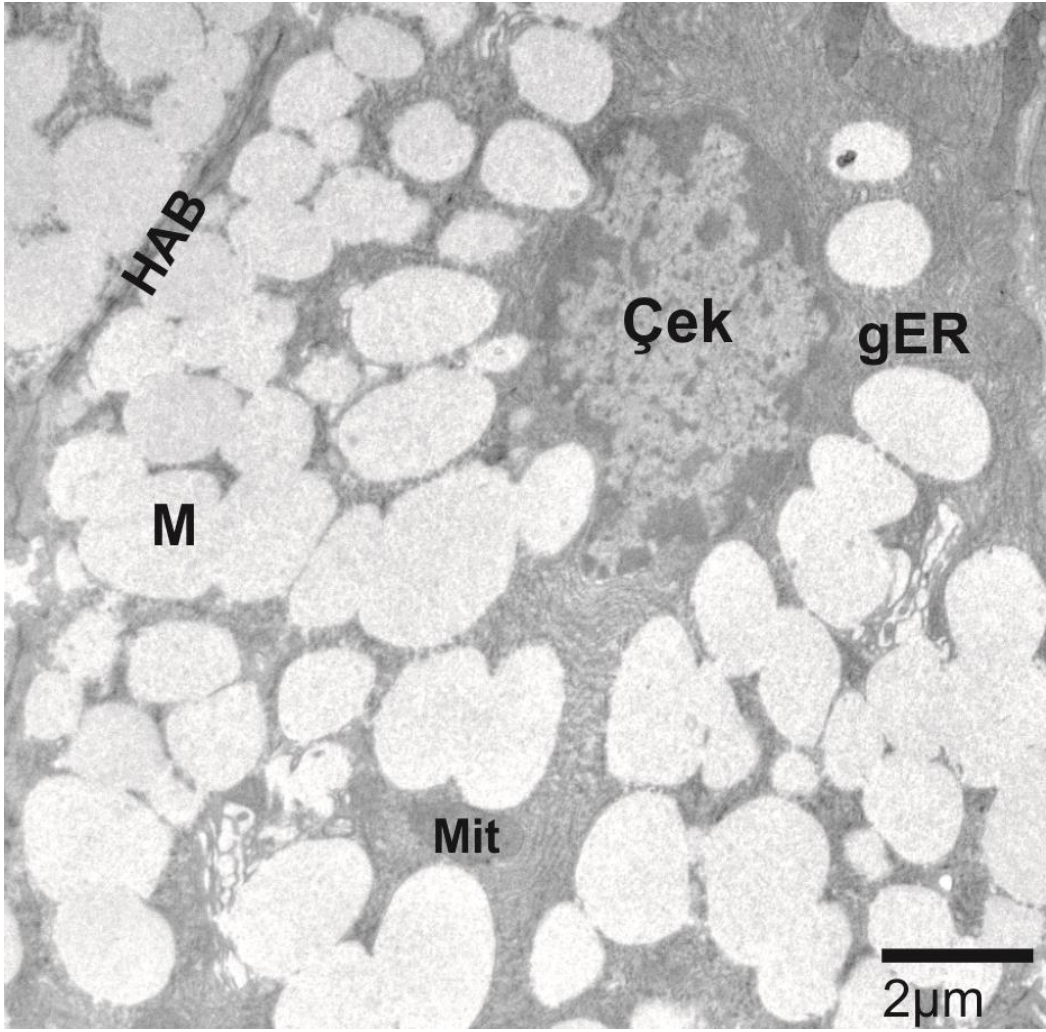


Şekil 4.18. DCPD proteininin uçuş ve yeryüzü kontrol grubu farelerinde ortalama immunogold işaretlenme yoğunluğu dağılımı.

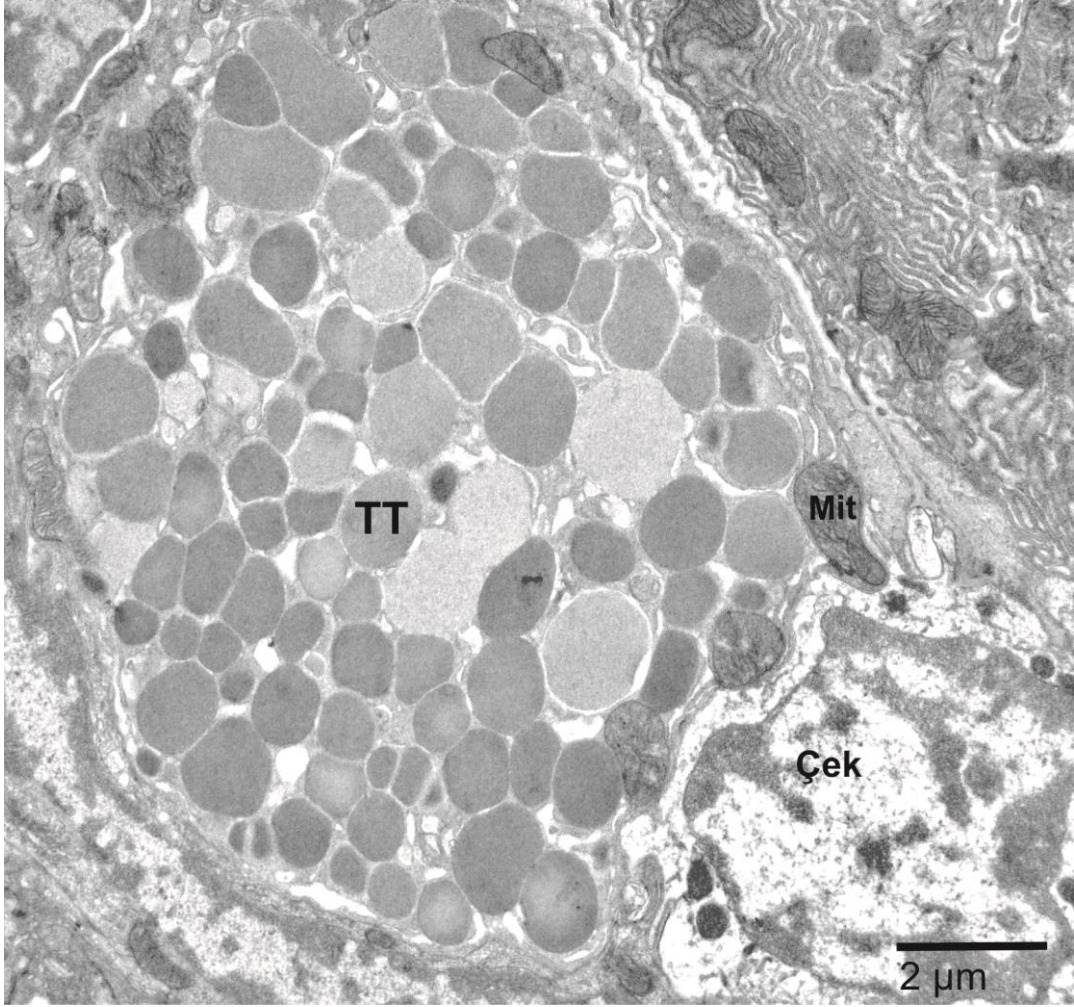
Sublingual ve submandibuler tükürük bezlerinde uçuş deney grubu ve yeryüzü kontrol grubu arasında morfolojik olarak herhangi bir farklılık bulunamamıştır (Şekiller 4.19, 4.20, 4.21, 4.22. 4.23).



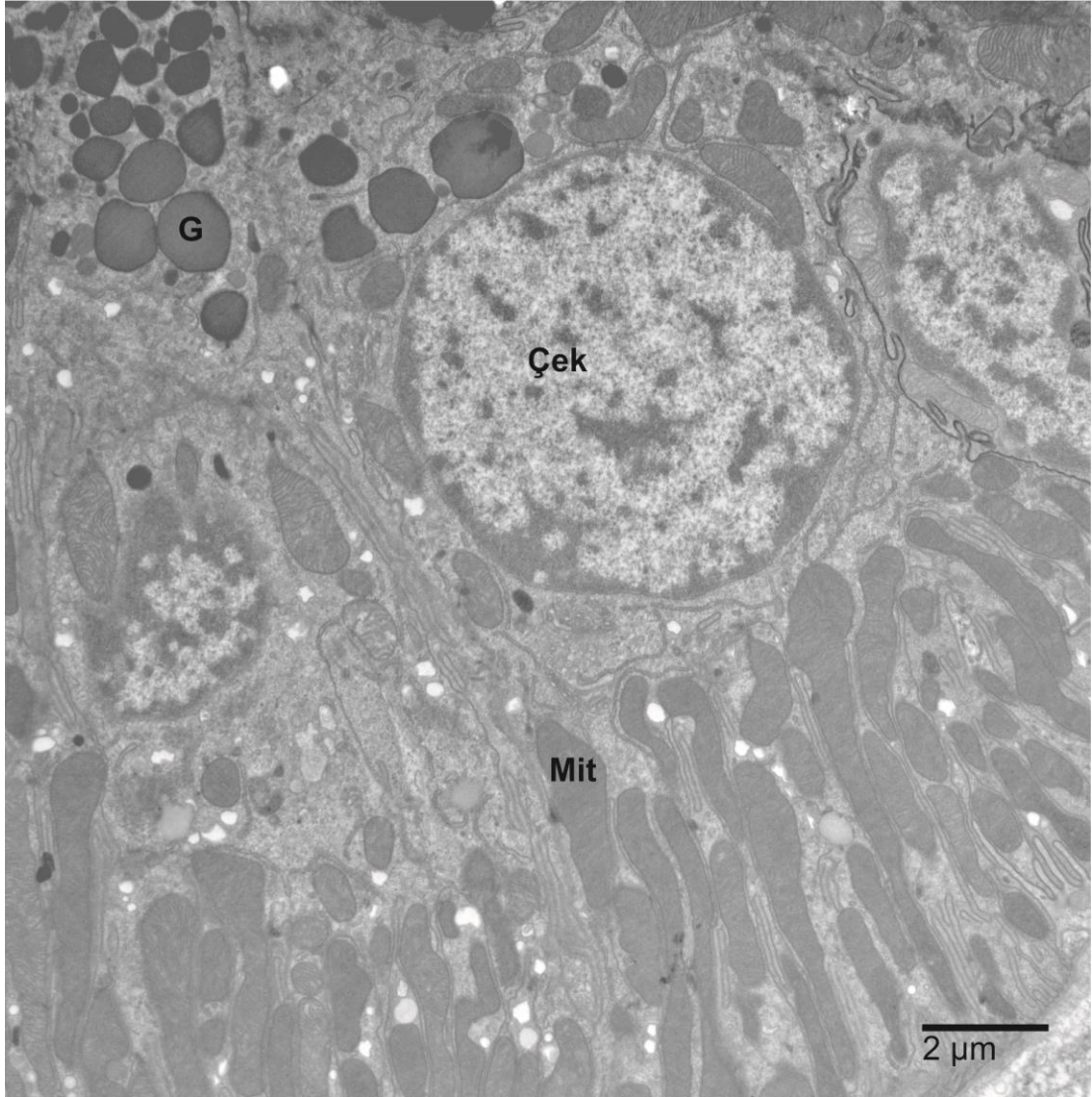
Şekil 4.19. Sublingual tükürük bezi seröz yarım ay hücresi (SYH), çekirdek (çek), müköz asinus hücrelerinin (M) bazolateralinde bulunan miyoepitelyal hücre (MEH).



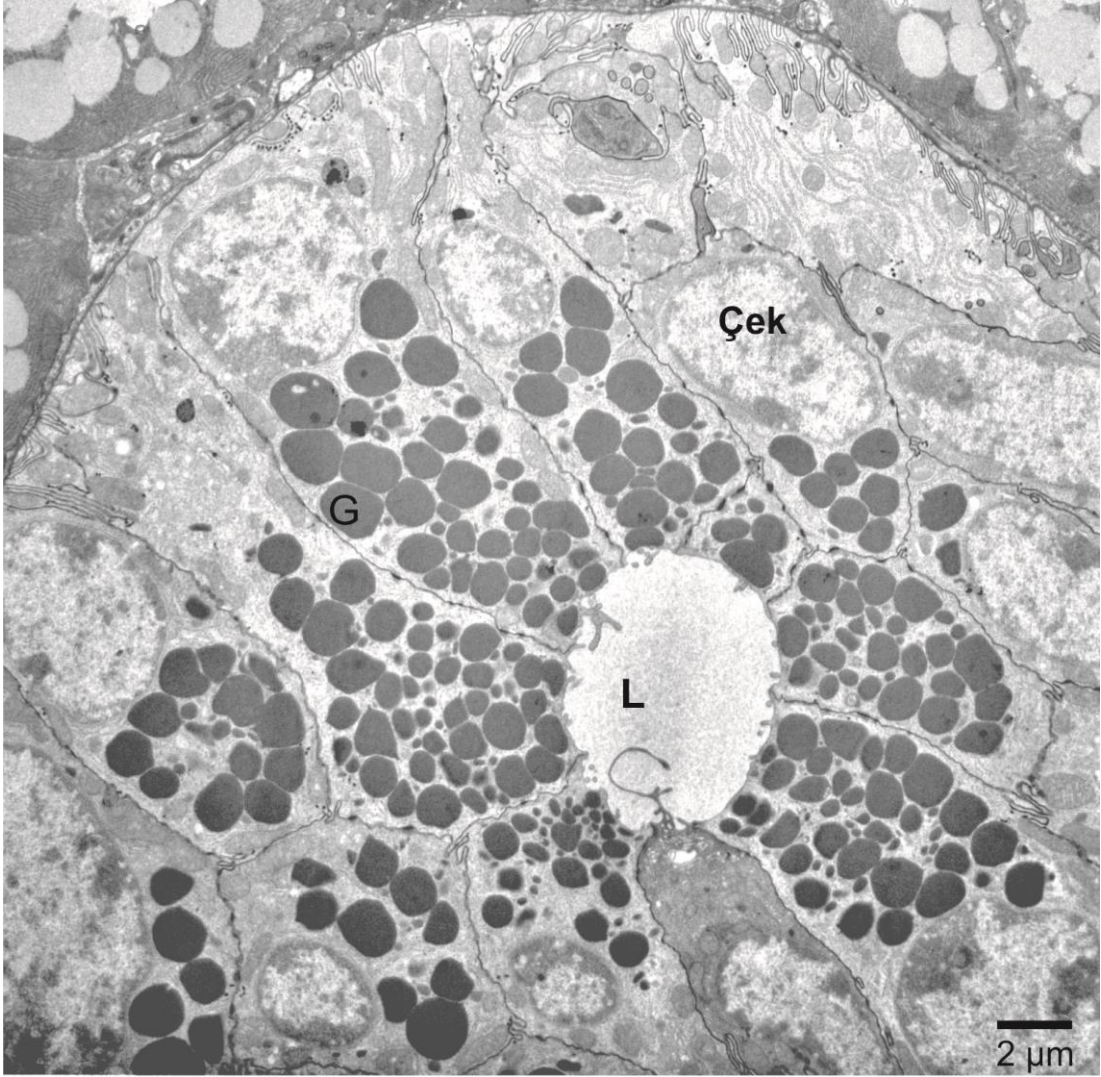
Şekil 4.20. Submandibuler tükürük bezi müköz asinus hücreleri (M), çekirdek (çek), granüllü endoplazmik retikulum (gER), mitokondri (Mit), hücreler arası bağlantı (HAB).



Şekil 4.21. Submandibuler tükürük bezi terminal tübül hücreleri (TT), çekirdek (çek), mitokondri (Mit).



Şekil 4.22. Submandibuler tükürük bezi granüler (G) çizgili kanal, çekirdek (çek), mitokondri (Mit).



Şekil 4.23. Submandibuler tükürük bezi granüler (G) interkalar kanal, çekirdek (çek), lümen (L).

5. TARTIŞMA

Hiyerarşik Doğrusal Model Analizinde; analizler, her bir protein için öncelikle farelerden alınan örnek sayısı ($n= 26-108$) ve daha sonra fare sayısı ($n=4$) esas alınarak iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk analiz sayesinde iç içe geçmiş verilerin yapısı korunmuş olup, her bir fareden alınan örneklerin immunogold işaretlenme yoğunluğu birleştirilerek tek bir ortalama değer olarak ifade edilmesi engellenmiştir. Böylece ikinci analize oranla daha fazla örnek sayısı ve daha düşük standart hata değerleri elde edilmiştir. Ayrıca ilk aşama sonucunda daha fazla sayıda istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir.

İlk aşama sonuçlarına göre SMG-C ($p < 0.001$), RII ($p < 0.001$), NGF ($p = 0.006$), Muc 19 ($p < 0.001$), SABP α ($p = 0.011$) proteinlerinde, istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanırken ikinci aşama sonuçlarına göre sadece SMG-C ($p = 0.087$) ve RII ($p = 0.077$) proteinlerinde istatistiksel olarak anlamlı olmaya yakın sonuçlar elde edilmiştir.

Bu çalışmanın çeşitli teknik avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Örneğin avantajları: fare tükürük bezlerinden alınan birkaç miligram doku örneğinin çalışma için yeterli olması ve ayrıca tükürük bezleri subkutenöz dokuda olduğu için diseksiyonunun da kolay olmasıdır.

En önemli dezavantajları ise dokuların bütünlüğünün korunması ve kargoyla yollanması sırasında herhangi bir teknik aksaklık çıkması halinde; uzay uçuşunun tekrarının mümkün olmaması nedeniyle telafisi olmayan kayıpların ortaya çıkmasıdır. Bu riski azaltmak için daha önce hem uçuş deney grubu hem de yeryüzü kontrol grubunda denenmiş ve başarısı kanıtlanmış çeşitli önlemler alınmıştır (9,10). Dokuların bütünlüğünü korumak için diseksiyondan hemen sonra tükürük bezleri %4 paraformaldehit / %0,25 glutaraldehit ile tespit edilmiş (fiksasyon), daha sonra yıkanıp 0.1 M kakodilat tampon içinde %1 paraformaldehitte saklanmıştır. Bu yöntemin diğer bir avantajı da aynı dokudan birden çok örnek alınarak her bir örnekte başka deneysel çalışmaların yapılmasına fırsat tanınmasıdır. Ayrıca, doku örnekleri bozulmadan saklanarak ileride çalışmaya dair ek bir bilgi gerektiğinde tekrar kullanılabilir olması sağlanmıştır.

İncelenecek doku örneğinin yapısının uygun fiksasyon yöntemi ile korunması immunogold işaretleme yönteminin başarılı olmasında çok önemlidir. Bu çalışmada

iki adet fareden alınan sublingual tükürük bezleri fiksasyon kalitesi düşük olduğu için çalışmaya dahil edilmemiştir. Uçuş deney grubu ve yeryüzü kontrol grubundaki farelerin immunogold işaretlenme yoğunluğunun, hayvanlar arasındaki biyolojik farklılıklara ve alınan kesit yüzeyindeki moleküllerin ne kadarının antikorlarla etkileşime girdiğine bağlı olarak değiştiği görülmektedir.

Uzay çalışmalarında da insan yerine başka canlıların kullanılmasının yeryüzü deney çalışmalarında olduğu gibi çeşitli faydaları vardır. İlk olarak insanlarda etik kurallardan dolayı yapılamayan deneylerin hayvanlarda yapılması daha uygundur. Ayrıca farklı canlı türlerinin birbiriyle karşılaştırılmasına olanak sağlar. Kemirgen hayvanlar küçük olmaları ve deney sırasında idarelerinin kolay olması nedeniyle hayvan deneyi çalışmalarında sıklıkla tercih edilir. Ayrıca, küçük olmaları uzay aracındaki kısıtlı alanda sayıca daha çok sayıda hayvanın bulundurulmasını sağlar. Kemirgen hayvanların bugüne kadar birçok çalışmada kullanılmış olması, bu hayvanlar hakkında köklü bir araştırma birikimi olmasını sağlamıştır. Bu çalışmada, farelerin tükürük bezleri yapısal ve işlevsel olarak insan tükürük bezlerine benzediği için fareler tercih edilmiştir.

Canlılar yeryüzüne iniş yaptıktan hemen sonra yeryüzü yerçekimi koşullarına adapte olduklarından ötürü uçuş sonrası kesilme işleminin hemen yapılması oldukça önemlidir. Bu çalışmada fareler yeryüzüne iniş yaptıktan sonra mümkün olan en kısa süre içinde, yani 5 saat sonra deneysel işlemlere tabi tutulmuştur.

Bu çalışmada değerlendirilen proteinlerin her birinin kendine özgü hücre içi lokalizasyonu ve görevi mevcuttur. Müsin 19 (Muc19), esas olarak fare sublingual tükürük bezi müköz hücrelerinde üretilir. Bu protein ayrıca, fare küçük tükürük bezleri, sublingual bez ve bulboüretal bez müköz hücreleri tarafından da üretilmektedir. İnsanlarda müsin üretimi ise, submandibuler bezin müköz hücrelerinde ve trakea submukoza bezlerinde yapılır (84).

Muc19/SMGC geni hem Muc19 hem de SMGC proteininin ekspresyonundan sorumludur. Submandibuler bez Protein C (SMGC proteini) submandibuler ve sublingual bezlerin gelişiminin erken dönemlerinde asiner hücrelerin farklılaşmasından sorumlu geçici bir proteindir (84,85). Muc 19 proteini miktarı arttıkça SMGC proteini azalır. Farelerde, SMGC proteini submandibuler bezde elektron yoğun granüllere sahip terminal tübül hücreleri tarafından salgılanır. SMGC

proteininin de mürin gibi lubrikasyon ve antibakteriyel fonksiyonları olduğu düşünülmektedir. İnsanlarda SMGC proteininin benzeri olup olmadığı bilinmemektedir (86).

Sinir büyüme faktörü (NGF) proteini farelerde birçok farklı dokuda çok az miktarda bulunmasına rağmen submandibuler tükürük bezinde önemli miktarda tespit edilmiştir (87). Erkek fare submandibuler tükürük bezinde dişilerdekine göre daha fazla NGF salgılanmaktadır (88). İmmunohistokimyasal çalışmalar NGF'nin granüler kanal sekresyon granüllerinden salgılandığını göstermiştir (89,90). NGF, sempatik sinir sistemi ve immün sistem organlarını inerve eden bazı duyuşal nöronların gelişimi ve fonksiyonunu etkilemekle birlikte, immün sistem ve nöroendokrin sistem hücreleri üzerinde de etkilidir (91,92). Neonatal sıçanlara NGF'nin verildiği bir çalışmada mast hücrelerinin sayısı ve büyüklüğünün arttığı tespit edilmiştir (93). Başka çalışmalarda ise NGF'nin mast hücrelerinden histamin salınımını (94) ve nötrofillerin fagositoz aktivitesini (95) arttırdığı görülmüştür

Epidermal büyüme faktörü (EGF) büyük miktarda erkek fare submandibular bezleri granüler kanal sekresyon granüllerinden az miktarda da diş farelerden salgılanır. EGF'nin tirozin kinaza bağlanması ile hücre büyümesi, çoğalması ve farklılaşmasını düzenleyen hücre içi sinyal iletimi başlar. EGF'nin farelerde kesici diş erupsiyonunu hızlandırdığı tespit edilmiştir (96).

Yapılan immunohistokimyasal çalışmalar sonucu protein kinaz A'nın katalitik ve düzenleyici birimleri tükürük bezleri dışında birçok farklı dokuda da bulunmuştur. İmmunogold işaretli RII; parotis ve pankreas sekresyon granülleri, sperm vezikülleri, bağırsak endotel hücreleri, ön ve ara hipofiz bezinde, RI ve katalitik birimler ise over granülosa hücrelerinde saptanmıştır (97). Protein kinaz A, karbonhidrat ve yağ metabolizması, büyüme ve gelişmede görevli bir enzimdir. Tükürükteki düzenleyici birimlerin görevi tam olarak bilinmese de cAMP bağlayıcı protein olarak işlev görüp ağız mikroflorasının metabolizma ve gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (98). RII, aynı zamanda β -adrenerjik stres cevabının bir göstergesidir (99).

Mednieks ve diğ. (14)'nin sıçan parotis asinus hücrelerinde yaptıkları immunohistokimyasal çalışma protein kinaz A'nın düzenleyici birimlerinin (RI,RII) çekirdek ve sitoplazma dışında asinus sekresyon granüllerinde de bulunduğunu

göstermiştir. Bu çalışmada ise RII proteini, fare sublingual tükürük bezinde sekresyon granüllerinde saptanmıştır. Çekirdekdeki altın partikülleri yoğunluğu ise primer antikorla işaretlenmeyen immunohistokimyasal kontrol grubu işaretlenme yoğunluğu ile benzer seviyede olduğu için bu durum çekirdekdeki immunogold işaretlenmenin özgül olmayan bir bağlanma olduğunu göstermektedir.

Prolinden zengin proteinler (PRP) isminden de anlaşıldığı üzere bol miktarda prolin amino asiti içerir ve tükürük sekresyon proteinlerinin %70'den fazlasını ihtiva ederler (100). Görevi Ca^{+2} bağlamak ve diyetdeki tanik asitin detoksifikasyonunu sağlar. PRP ekspresyonu cAMP ile düzenlenir. Sıçan parotis ve submandibuler tükürük bezlerinde katekolamin hormon stimülasyonu ve tanik asit ile beslenme PRP artışına neden olmuştur (101).

Parotis sekresyon proteini (PSP), PLUNC (palate, akciğer, nazal epitel) protein ailesine ait, fare ve sıçan parotis bezinde bol miktarda bulunan bir proteindir (102). Bu protein, fare sublingual bezinde düşük miktarda olmasına rağmen birçok fare türünde submandibuler bezde saptanamamıştır, ancak insanlarda submandibuler bezde de tespit edilmiştir (103, 104). PSP, bakterisidal/geçirgenlik artıran protein (BPI) ve lipopolisakkarit bağlayıcı protein (LBP)'e benzer, antibakteriyel ve antiinflamatuvar fonksiyona sahiptir, oral kavite, üst hava yolları ve akciğerleri patojenlere karşı korur (104).

Yarım ay hücrelerinden salgılanan Parotis Proteini (DCPP), fare sublingual tükürük bezlerinde seröz yarım ay hücreleri ve parotis bezi interkalar kanallarında üretilir (105). Bu protein, sıçanlardaki Ortak Tükürük Bezi Proteininin (CSP1) faredeki benzeridir (106). İnsanlardaki HRPE773 proteini, sublingual bezden salgılanması ve farelerdeki CSP1/DCPP proteinine yapısal olarak benzemesinden dolayı DCPP proteininin insandaki benzeri olduğu düşünülmektedir. Yapısındaki lektin karbonhidrat bağlayıcı proteinden dolayı antimikrobiyal etkisinin olduğu ileri sürülmektedir (107).

Tükürük Androjen Bağlayıcı Protein (SABP), ortak bir α alt birimine disülfid bağı ile bağlı β veya γ alt biriminden oluşan, submandibuler tükürük bezi kaynaklı bir proteindir. SABP, androjen hormonlarından testosteron ve progesteronu bağlarken, kolesterol ve östradiol hormonlarını bağlamaz. SABP farelerde feromon rolü

oyunarak ağız ve/veya idrar, dışkı kokusu yoluyla dişi farelerin eşlerini seçmelerini sağlar (108).

Tükürük bezi proteinleri seviyesi birçok etkene bağılı olarak değişebilir. Bu çalışmada kullanılan bütün fareler aynı yaşta dişi farelerdir ve hepsi aynı diyetle beslenmiştir. Böylece yaş, cinsiyet ve diyetin uçuş ve yeryüzü kontrol grubuna olan etkileri elenmiştir. Mekanik kuvvetlerin olmadığı ağırlıksız uzay ortamında, kemik yapımı ve yıkımı arasındaki dengesizlik vücuttan Ca^{+2} atılımına neden olur (5). Ayrıca yeni bir ortama adapte olmanın yarattığı stres ise protein ağırlıklı kilo kaybı sebebidir. Uzay ortamındaki bu fizyolojik değişiklikler, Ca^{+2} ve protein ağırlıklı diyet gereksinimi doğurmaktadır (109). Bu çalışmada NASA'nın geliştirdiği, birçok kısa süreli (<21 gün) uzay uçuşunda başarısı kanıtlanmış yarı katı diyet uygulanmıştır.

Hormonal değişiklikler de tükürük bezi protein seviyesini etkilemektedir. NGF, EGF proteinin kısırlaştırılmış farelerde azaldığı ve farelere testosteron verildiğinde arttığı tespit edilmiştir (110,111). Bueker ve Weis (112) yaptıkları çalışmada NGF proteininin hamilelik ve emzirme döneminde arttığını rapor etmişlerdir. Erkek farelere tiroid hormonu verildiğinde ise submandibuler bezde NGF, EGF protein miktarının arttığı saptanmıştır (96,113) .

Tükürük peroksidaz enzimi ile tükürükteki immunoglobulin A (sIgA)'nın hamilelik, menstruasyon gibi östrojen hormonu seviyesinin arttığı dönemlerde yükseldiği tespit edilmiştir (114,115).

Tükürük bezleri protein seviyesini etkileyen diğer bir hormon ise insülin hormonudur. Kasayama ve diğ. (116)'nin Tip 1 diabetli farelerde yaptıkları deneysel çalışmada EGF proteininin, Szczepanski ve diğ. (3)'nin yaptıkları çalışmada ise amilaz, prolinden zengin protein ve parotis sekresyon proteinlerinin azaldığı bulunmuştur.

Mednieks ve diğ. (117) streptozotosinle indüklenmiş diabetli sıçan tükürük bezlerinde yaptıkları çalışmada prolinden zengin protein ve Muc 10 proteinlerinin azaldığını saptamışlardır. Ayrıca RII'nin parotis bezi asinus hücreleri çekirdek ve sitoplazmasında azaldığı sekresyon granüllerinde ise değişmediği görülmüştür. Submandibuler bezde de parotis bezine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu değişikliklere ek olarak diabetli sıçanlarda kontrol grubuna göre daha fazla sayıda lizozom ve otofajik vakuoller, bazal sitoplazmada da yağ damlaları saptanmıştır.

Farmakolojik maddeler de tükürük bezi protein miktarını etkileyen diğer bir faktördür. Vugman ve Hand (118) sıçan parotis bezinde β -adrenerjik agonist olan isoproterenol ile yaptıkları çalışma sonucu amilaz ve parotis sekresyon proteininin azaldığını, prolinden zengin proteinin arttığını bulmuşlardır. Matsuura ve Hand (119) ise isoproterenol ile sıçan submandibuler tükürük bezinde yaptıkları başka bir çalışmada sistatin, müsin ve prolinden zengin proteinin arttığını, SMG-C proteininin de asinus sekresyon granüllerinde azalırken interkalar kanallarda arttığını saptamışlardır.

Uzay uçuşu esnasındaki değişen fiziksel ve psikolojik şartlar (gürültü, titreşim, radyasyon, malnutrisyon, uyku düzenindeki değişiklik, kısıtlı bir alanda gruplar halinde kapalı kalma) birer stres kaynağıdır. Yer çekimi değişikliği de canlılar üzerinde önemli rol oynayan bir stres faktörüdür. İnsanlarda strese karşı cevapta etkili hipotalamus-pituiter-adrenokortikal sistem ve sempatik adrenomedullar sistem olmak üzere iki adet nöroendokrin sistem mevcuttur. Artan katekolamin hormon seviyesi strese karşı vücudun bir cevabıdır. Sempatik adrenomedullar sistem katekolamin salınımını düzenler. Ancak tükürükteki katekolamin seviyesi sempatik adrenomedullar sistem aktivitesi ile doğrudan ilişkili değildir (120). Bunun yerine tükürükte sempatik uyarıyla salgısı artan amilaz enzimi SM aktivitesinin değerlendirilmesinde kullanılabilir (121).

Hormonal cevabın düzenlenmesinde görevli ikincil haberci olan cAMP stres durumunda artan katekolamin hormon seviyesinin ölçülmesinde kullanılabilen diğer bir göstergedir. Ancak cAMP'nin ATP'ye yıkımı fosfodiesteraz enzimi ile hızla gerçekleştiğinden dolayı cAMP konsantrasyonu direk olarak ölçülemez. Protein kinaz A'nın düzenleyici birimleri cAMP bağlayıcı reseptör işlevine sahiptir, bu nedenle tükürükteki protein kinaz A'nın düzenleyici birimleri katekolamin hormon cevabının bir göstergesidir (99).

HPA sisteminde pituiter bezden salgılanan adrenokortikotropin hormonu (ACTH) kortizol salınımını düzenlediği bilinmektedir. Tükürükteki kortizol hormonu seviyesi kandaki kortizol hormonu seviyesi ile yakından ilişkilidir, bu nedenle Kirschbaum ve diğ. (122), HPA aktivitesinin değerlendirilmesinde tükürük testi yapılabileceğini ileri sürmüştür.

Çeşitli çevresel ve fizyolojik uyarıların, biyolojik sistemler üzerine etkisini incelemek için tükürük bezleri ve sekresyonlarından faydalanılabilir. Çünkü tükürük girişimsel bir işlem olmaksızın uyarılara karşı fizyolojik ve farmakolojik cevabın ölçülmesini sağlayan en uygun vücut sıvısıdır. Tükürük bezi fonksiyonu ve içeriğindeki değişiklikler uzay uçuşuna karşı oluşan sistemik cevabın bir göstergesidir. Çalışmamızda ortaya çıkan sonuçlar çok sayıda tükürük bezi sekresyon proteini miktarının uçuş ve kontrol grubunda farklı olduğunu göstermiştir.

Mednieks ve diğ. (123) STS-131 ve STS-135 uzay uçuşlarındaki fare parotis bezleri üzerinde yaptıkları immunohistokimyasal çalışmada birçok farklı proteini uçuş deney grubu ve yeryüzü kontrol grubunda değerlendirmişlerdir. Amilaz ve prolinden zengin proteinin uçuş deney grubunda yeryüzü kontrol grubuna göre azaldığını saptamışlardır. Protein kinaz A'nın düzenleyici birimi II (RII) ise sitoplazmada ve sekresyon granüllerinde azaldığı saptanırken, çekirdekte herhangi bir değişiklik izlenmemiştir. DCPD'nin ise interkalar kanal sekresyon granüllerindeki immunogold işaretlenme yoğunluğu uçuş deney grubunda yeryüzü kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Parotis sekresyon proteini için ise herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Elde edilen bu sonuçlar yer çekimi nedeniyle protein miktarında oluşan değişikliklerin hücre çeşidine bağlı olduğunu göstermektedir.

Bizim çalışmamızda ise STS-131 uzay uçuşundaki farelerden elde edilen submandibuler ve sublingual tükürük bezleri immunohistokimyasal analizler için kullanılmıştır. Sayısal immunogold işaretleme yöntemi ile TEM'de incelendiğinde SABP α ve PRP submandibuler bez müköz hücrelerinde, EGF submandibular bez asinus hücreleri sekresyon granüllerinde, PSP ve RII sublingual bez seröz yarım ay hücrelerinde uçuş deney grubunda yeryüzü kontrol grubuna göre daha yüksek miktarda saptanmıştır. DCPD sublingual bez seröz yarım ay hücreleri, NGF submandibuler bez asinus hücreleri sekresyon granüllerinde, Muc 19 submandibuler bez müköz hücrelerinde, SMG-C submandibuler bez terminal tübül hücrelerinde yeryüzü kontrol grubunda uçuş kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur.

Mednieks ve Hand (9) SpaceLab 3 uçuşuna ait sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada uçuş ve yeryüzü kontrol grubu parotis bezindeki biyokimyasal ve morfolojik değişiklikleri karşılaştırmış ve uçuş grubunda asinuslarda sekresyon granülü sayısının, çizgili kanallarda da glikojen miktarının arttığını saptamışlardır.

Ayrıca kilo kaybeden uçuş grubu hayvanlarında otofajik vakuol, bazal yerleşimli yağ damlaları ve halka şekilli lamellerde artış tespit etmişler ve bu değişiklikleri değişen yer çekimi koşullarının farelerin yeme düzenini değiştirmesine bağlamışlardır.

Mednieks ve diğ. (123)'nin STS-131 ve STS-135 uçuşlarına ait sıçan parotis bezlerinde yaptıkları diğer bir çalışmada, asinus hücreleri dışında interkalar kanal ve bazı çizgili kanal hücrelerinde de geniş, elektron yoğun vakuoller tespit etmişlerdir. Ancak bu vakuoller yeryüzü kontrol grubunda gözlenmemiştir. Uçuş deney grubu ve yeryüzü kontrol grubu arasındaki bu farklılık, değişen yer çekimi koşullarının uçuş grubu farelerinin kanal hücrelerinin fonksiyonunu etkilediğini göstermektedir.

Bu çalışmada ise uçuş grubu submandibuler ve sublingual tükürük bezi asinus ve kanal morfolojisi yeryüzü kontrol grubu ile karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık bulunamamıştır. Bu durum uzay uçuşunun farelerde doku hasarına yol açmadan uzay koşullarına adaptasyonun sağlandığını göstermektedir. Ancak bu adaptasyonun yeryüzüne döndükten sonra mı olduğu, eğer öyleyse ne kadar süre sonra olduğu bilinmemektedir. Farelerin deneysel işlemlere tabi tutulmasının yeryüzüne iniş yaptıktan birkaç gün sonra yapıldığı çalışmalar bu bilinmezliği açıklığa kavuşturmada faydalı olabilir. Hatta belirli zaman aralıklarıyla yapılan incelemeler değişikliklerin meydana geldiği zamanla ilgili daha detaylı bilgi edinmemizi sağlayabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında yer çekiminin tükürük bezlerinin protein yapısına olan etkisini incelemek için uzaya gönderilen farelerin submandibuler ve sublingual tükürük bezi proteinleri immunogold işaretleme yöntemi kullanılarak geçirimli elektron mikroskopunda (TEM) incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre;

- Yarım ay hücrelerinden salgılanan parotis proteini (DCPP); sublingual tükürük bezi seröz yarım ay hücreleri sekresyon granüllerinde uçuş deney grubunda, yeryüzü kontrol grubuna göre daha düşük miktarda tespit edilmiştir.
- Müsin 19 (Muc 19); proteini sublingual tükürük bezi müköz hücrelerinde uçuş deney grubunda, yeryüzü kontrol grubuna göre daha düşük miktarda tespit edilmiştir.
- Protein Kinaz A'nın düzenleyici birimi (RII); sublingual tükürük bezi asinus hücreleri sekresyon granüllerinde uçuş deney grubunda, yeryüzü kontrol grubuna göre daha düşük miktarda tespit edilmiştir.
- Parotis sekresyon proteini (PSP); sublingual tükürük bezi asinus hücreleri sekresyon granüllerinde uçuş deney grubunda, yeryüzü kontrol grubuna göre daha yüksek miktarda tespit edilmiştir.
- Submandibuler bez protein C (SMGC); submandibuler tükürük bezi terminal tübül hücrelerinde uçuş deney grubunda, yeryüzü kontrol grubuna göre daha düşük miktarda tespit edilmiştir.
- Epidermal büyüme faktörü (EGF); proteini submandibuler tükürük bezi asinus hücreleri sekresyon granüllerinde uçuş deney grubunda, yeryüzü kontrol grubuna göre daha yüksek miktarda tespit edilmiştir.
- Sinir büyüme faktörü (NGF); proteini submandibuler tükürük bezi asinus hücreleri sekresyon granüllerinde uçuş deney grubunda, yeryüzü kontrol grubuna göre daha düşük miktarda tespit edilmiştir.
- Submandibuler bez androjen bağlayıcı protein (SABP α); submandibuler tükürük bezi müköz hücrelerinde uçuş deney grubunda, yeryüzü kontrol grubuna göre daha yüksek miktarda tespit edilmiştir.

- Prolinden zengin protein (PRP); submandibuler tükürük bezi müköz hücrelerinde uçuş deney grubunda, yeryüzü kontrol grubuna göre daha yüksek miktarda tespit edilmiştir.
- Sublingual ve submandibuler tükürük bezlerinde uçuş deney grubu ve yeryüzü kontrol grubu arasında morfolojik olarak herhangi bir farklılık bulunamamıştır.

Tükürük bezindeki proteinlerin miktarının ölçülmesi, uzay uçuşunun oral kavitenin fizyolojisine ve sekresyon hücrelerinin hücresel sinyal mekanizmasına olan etkisini göstermektedir. Tükürük bezi sekresyon granüllerinde bulunan proteinler tükürüğe salgılanarak yer çekimi etkisinin izlenmesini sağlar. Tükürük uzun yıllardır biyokimyasal genetik belirleyici olarak kullanılmaktadır. İleri çalışmalar tükürüğün teşhis ve prognoz tespiti için biyosensör olarak kullanılmasını sağlayan testlerin geliştirilmesini sağlayacaktır. Sadece birkaç damla oral sıvı kullanan tükürük test kitleri hiçbir girişimsel işlem olmaksızın dental ve medikal teşhis için kullanılabilir. Böyle bir tükürük test kiti uzay uçuşlarına karşı insan vücudu reaksiyonunun da ölçülmesinde kullanılabilir.

Sonuç olarak bu çalışma, yer çekiminin biyolojik sistemler üzerindeki etkileri ile ilgili teorik bilgi ve pratik uygulamaların artmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Mednieks, M. I., Epstein, P. M., Hachisu, R., Hand, A. R., ve Esquire, R. G. (1994). Cyclic AMP-reactive proteins in human saliva. *Archives of Oral Biology*, 39(10), 869-875.
2. Burke, J. C., Evans, C. A., Crosby, T. R., ve Mednieks, M. I. (2002). Expression of secretory proteins in oral fluid after orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 121(3), 310-315.
3. Szczepanski, A., Mednieks, M. I., ve Hand, A. R. (1998). Expression and distribution of parotid secretory proteins in experimental diabetes. *European Journal of Morphology*, 36 Suppl, 240-246.
4. Lane, H. W., ve Feedback, D. L. (2002). History of nutrition in space flight: Overview. *Nutrition*, 18(10), 797-804.
5. Holick, M. F. (1998). Perspective on the impact of weightlessness on calcium and bone metabolism. *Bone*, 22(5 Suppl), 105S-111S.
6. Antonutto, G., ve di Prampero, P. E. (2003). Cardiovascular deconditioning in microgravity: Some possible countermeasures. *European Journal of Applied Physiology*, 90(3-4), 283-291.
7. Meehan, R., Whitson, P., ve Sams, C. (1993). The role of psychoneuroendocrine factors on spaceflight-induced immunological alterations. *Journal of Leukocyte Biology*, 54(3), 236-244.
8. Mednieks, M. I., ve Hand, A. R. (1985). Biochemical and morphological evaluation of the effects of space flight on rat salivary glands. *The Physiologist*, 28(6 Suppl), S215-6.
9. Mednieks, M. I., ve Hand, A. R. (1987). Salivary gland ultrastructure and cyclic AMP-dependent reactions in spacelab 3 rats. *The American Journal of Physiology*, 252(2 Pt 2), R233-9.
10. Mednieks, M. I., Fine, A. S., Oyama, J., ve Philpott, D. E. (1987). Cardiac muscle ultrastructure and cyclic AMP reactions to altered gravity conditions. *The American Journal of Physiology*, 252(2 Pt 2), R227-32.
11. Carlson, D. M., Zhou, J., & Wright, P. S. (1991). Molecular structure and transcriptional regulation of the salivary gland proline-rich protein multigene families. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 41, 1-22.

12. Bernfeld, P. (1951). Enzymes of starch degradation and synthesis. *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry*, 12, 379-428
13. Hand, A. R. (1972). The effects of acute starvation on parotid acinar cells. ultrastructural and cytochemical observations on ad libitum-fed and starved rats. *The American Journal of Anatomy*, 135(1), 71-92.
14. Mednieks, M. I., Jungmann, R. A., ve Hand, A. R. (1987). Ultrastructural immunocytochemical localization of cyclic AMP-dependent protein kinase regulatory subunits in rat parotid acinar cells. *European Journal of Cell Biology*, 44(2), 308-317.
15. Lima, D. P., Diniz, D. G., Moimaz, S. A., Sumida, D. H., ve Okamoto, A. C. (2010). Saliva: Reflection of the body. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(3), e184-8.
16. Yamashina, S., Tamaki, H., ve Katsumata, O. (1999). The serous demilune of rat sublingual gland is an artificial structure produced by conventional fixation. *Archives of Histology and Cytology*, 62(4), 347-354.
17. Pinkstaff, C. A. (1993). Serous, seromucous, and special serous cells in salivary glands. *Microscopy Research and Technique*, 26(1), 21-31.
18. Ogawa, Y. (2003). Immunocytochemistry of myoepithelial cells in the salivary glands. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 38(4), 343-426.
19. Tamarin, A. (1966). Myoepithelium of the rat submaxillary gland. *Journal of Ultrastructure Research*, 16(3), 320-338.
20. Sternlicht, M. D., ve Barsky, S. H. (1997). The myoepithelial defense: A host defense against cancer. *Medical Hypotheses*, 48(1), 37-46.
21. Sternlicht, M. D., Kedeshian, P., Shao, Z. M., Safarians, S., ve Barsky, S. H. (1997). The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. *Clinical Cancer Research*, 3(11), 1949-1958.
22. Gresik, E. W. (1994). The granular convoluted tubule (GCT) cell of rodent submandibular glands. *Microscopy Research and Technique*, 27(1), 1-24.
23. Denny, P. C., Ball, W. D., ve Redman, R. S. (1997). Salivary glands: A paradigm for diversity of gland development. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 8(1), 51-75.

24. Tandler, B. (1993). Structure of the duct system in mammalian major salivary-glands. *Microscopy Research and Technique*, 26(1), 57-74.
25. Hand, A. R. (2013). Ten cate's oral histology: Development, structure, and function. In A. Nanci, & A. R. Ten Cate (Eds.), (8th ed.,). St. Louis, Mo.: Elsevier.
26. Treuting, P. M., & Dintzis, S. M. (2012). Salivary glands. In P. M. Treuting, S. M. Dintzis, C. W. Frevert, D. Liggitt, K. S. Montine & I. ebrary (Eds.), *Comparative anatomy and histology* (1st ed., pp. 461). London: Elsevier.
27. Riva, A., Loffredo, F., Puxeddu, R., ve Testa Riva, F. (1999). A scanning and transmission electron microscope study of the human minor salivary glands. *Archives of Oral Biology*, 44 Suppl 1, S27-31.
28. Hand, A. R., Pathmanathan, D., ve Field, R. B. (1999). Morphological features of the minor salivary glands. *Archives of Oral Biology*, 44 Suppl 1, S3-10.
29. Borghese, E. (1950). The development in vitro of the submandibular and sublingual glands of mus musculus. *Journal of Anatomy*, 84(3), 287-302.
30. Tucker, A. S. (2007). Salivary gland development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18(2), 237-244.
31. Jaskoll, T., ve Melnick, M. (1999). Submandibular gland morphogenesis: Stage-specific expression of TGF-alpha/EGF, IGF, TGF-beta, TNF, and IL-6 signal transduction in normal embryonic mice and the phenotypic effects of TGF-beta2, TGF-beta3, and EGF-r null mutations. *The Anatomical Record*, 256(3), 252-268.
32. Melnick, M., ve Jaskoll, T. (2000). Mouse submandibular gland morphogenesis: A paradigm for embryonic signal processing. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 11(2), 199-215.
33. Jaskoll, T., Chen, H., Min Zhou, Y., Wu, D., ve Melnick, M. (2001). Developmental expression of survivin during embryonic submandibular salivary gland development. *BMC Developmental Biology*, 1, 5.
34. Melnick, M., Chen, H., Zhou, Y., ve Jaskoll, T. (2001a). Embryonic mouse submandibular salivary gland morphogenesis and the TNF/TNF-R1 signal transduction pathway. *The Anatomical Record*, 262(3), 318-330.

35. Melnick, M., Chen, H., Min Zhou, Y., ve Jaskoll, T. (2001). The functional genomic response of developing embryonic submandibular glands to NF-kappa B inhibition. *BMC Developmental Biology*, 1, 15.
36. Melnick, M., Chen, H., Zhou, Y. M., ve Jaskoll, T. (2001b). Interleukin-6 signaling and embryonic mouse submandibular salivary gland morphogenesis. *Cells, Tissues, Organs*, 168(4), 233-245.
37. Jaskoll, T., Zhou, Y. M., Trump, G., ve Melnick, M. (2003). Ectodysplasin receptor-mediated signaling is essential for embryonic submandibular salivary gland development. *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 271(2), 322-331.
38. Sakakura, T., Nishizuka, Y., ve Dawe, C. J. (1976). Mesenchyme-dependent morphogenesis and epithelium-specific cytodifferentiation in mouse mammary gland. *Science*, 194(4272), 1439-1441.
39. Kratochwil, K. (1969). Organ specificity in mesenchymal induction demonstrated in the embryonic development of the mammary gland of the mouse. *Developmental Biology*, 20(1), 46-71.
40. Tyler, M. S., ve Koch, W. E. (1977). In vitro development of palatal tissues from embryonic mice. III. interactions between palatal epithelium and heterotypic oral mesenchyme. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 38, 37-48.
41. Kusakabe, M., Sakakura, T., Sano, M., ve Nishizuka, Y. (1985). A pituitary-salivary mixed gland induced by tissue recombination of embryonic pituitary epithelium and embryonic submandibular gland mesenchyme in mice. *Developmental Biology*, 110(2), 382-391.
42. Lawson, K. A. (1974). Mesenchyme specificity in rodent salivary gland development: The response of salivary epithelium to lung mesenchyme in vitro. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 32(2), 469-493.
43. Ball, W. D. (1974). Development of the rat salivary glands. 3. mesenchymal specificity in the morphogenesis of the embryonic submaxillary and sublingual glands of the rat. *The Journal of Experimental Zoology*, 188(3), 277-288.
44. Brownell, A. G., Bessem, C. C., ve Slavkin, H. C. (1981). Possible functions of mesenchyme cell-derived fibronectin during formation of basal lamina.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 78(6), 3711-3715.

45. Hardman, P., ve Spooner, B. S. (1992). Localization of extracellular matrix components in developing mouse salivary glands by confocal microscopy. *The Anatomical Record*, 234(3), 452-459.
46. Kadoya, Y., Salmivirta, K., Talts, J. F., Kadoya, K., Mayer, U., Timpl, R., ve diğeri (1997). Importance of nidogen binding to laminin gamma1 for branching epithelial morphogenesis of the submandibular gland. *Development*, 124(3), 683-691.
47. Bernfield, M. R., ve Banerjee, S. D. (1972). Acid mucopolysaccharide (glycosaminoglycan) at the epithelial-mesenchymal interface of mouse embryo salivary glands. *The Journal of Cell Biology*, 52(3), 664-673.
48. Bernfield, M. R., Banerjee, S. D., ve Cohn, R. H. (1972). Dependence of salivary epithelial morphology and branching morphogenesis upon acid mucopolysaccharide-protein (proteoglycan) at the epithelial surface. *The Journal of Cell Biology*, 52(3), 674-689.
49. Costell, M., Gustafsson, E., Aszodi, A., Morgelin, M., Bloch, W., Hunziker, E., ve diğeri. (1999). Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *The Journal of Cell Biology*, 147(5), 1109-1122.
50. Hayakawa, T., Kishi, J., ve Nakanishi, Y. (1992). Salivary gland morphogenesis: Possible involvement of collagenase. *Matrix, Supplement*, 1, 344-351.
51. Sakai, T., Larsen, M., ve Yamada, K. M. (2003). Fibronectin requirement in branching morphogenesis. *Nature*, 423(6942), 876-881.
52. Nakanishi, Y., Uematsu, J., Takamatsu, H., Fukuda, Y., ve Yoshida, K. (1993). Removal of heparan sulfate chains halted epithelial branching morphogenesis of the developing mouse submandibular gland in vitro. *Development, Growth and Differentiation*, 35(4), 371-384.
53. Kashimata, M., & Gresik, E. W. (1997). Epidermal growth factor system is a physiological regulator of development of the mouse fetal submandibular gland and regulates expression of the alpha6-integrin subunit. *Developmental Dynamics*, 208(2), 149-161.

54. Kashimata, M. W., Sakagami, H. W., & Gresik, E. W. (2000). Intracellular signalling cascades activated by the EGF receptor and/or by integrins, with potential relevance for branching morphogenesis of the fetal mouse submandibular gland. *European Journal of Morphology*, 38(4), 269-275.
55. Jaskoll, T., Zhou, Y. M., Chai, Y., Makarenkova, H. P., Collinson, J. M., West, J. D., ve diğerleri. (2002). Embryonic submandibular gland morphogenesis: Stage-specific protein localization of FGFs, BMPs, Pax6 and Pax9 in normal mice and abnormal SMG phenotypes in FgfR2-IIIc(+/ Δ), BMP7(-/-) and Pax6(-/-) mice. *Cells, Tissues, Organs*, 170(2-3), 83-98.
56. Jaskoll, T., Choy, H. A., ve Melnick, M. (1994). Glucocorticoids, TGF-beta, and embryonic mouse salivary gland morphogenesis. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology*, 14(4), 217-230.
57. Ritvos, O., Tuuri, T., Eramaa, M., Sainio, K., Hilden, K., Saxen, L., ve diğerleri. (1995). Activin disrupts epithelial branching morphogenesis in developing glandular organs of the mouse. *Mechanisms of Development*, 50(2-3), 229-245.
58. Scannapieco, F. A., Torres, G., ve Levine, M. J. (1993). Salivary alpha-amylase: Role in dental plaque and caries formation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 4(3-4), 301-307.
59. Teeuw, W., Bosch, J. A., Veerman, E. C., ve Amerongen, A. V. (2004). Neuroendocrine regulation of salivary IgA synthesis and secretion: Implications for oral health. *Biological Chemistry*, 385(12), 1137-1146.
60. Tabak, L. A. (1990). Structure and function of human salivary mucins. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine : An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 1(4), 229-234.
61. Niedermeier, W. H., ve Kramer, R. (1992). Salivary secretion and denture retention. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 67(2), 211-216.
62. Ihalin, R., Loimaranta, V., ve Tenovuo, J. (2006). Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 445(2), 261-268.
63. Han, T. K., ve Dao, M. L. (2007). Enhancement of salivary IgA response to a DNA vaccine against streptococcus mutans wall-associated protein A in mice by plasmid-based adjuvants. *Journal of Medical Microbiology*, 56(Pt 5), 675-680.

64. Hand, A. R. (1991). Salivary glands. In B. J. Orban, & S. N. Bhaskar (Eds.), *Orban's oral histology and embryology* (11th ed., pp. 489). St. Louis: Mosby.
65. Tarnawski, A. S. (2005). Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Digestive Diseases and Sciences*, 50 Suppl 1, S24-33.
66. Jorissen, R. N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T. P., Ward, C. W., ve Burgess, A. W. (2003). Epidermal growth factor receptor: Mechanisms of activation and signalling. *Experimental Cell Research*, 284(1), 31-53.
67. Thaysen, J. H., Thorn, N. A., ve Schwartz, I. L. (1954). Excretion of sodium, potassium, chloride and carbon dioxide in human parotid saliva. *The American Journal of Physiology*, 178(1), 155-159.
68. Watson, E. L., Abel, P. W., DiJulio, D., Zeng, W., Makoid, M., Jacobson, K. L., ve diğ erleri. (1996). Identification of muscarinic receptor subtypes in mouse parotid gland. *The American Journal of Physiology*, 271(3 Pt 1), C905-13.
69. Dai, Y. S., Ambudkar, I. S., Horn, V. J., Yeh, C. K., Kousvelari, E. E., Wall, S. J., ve diğ erleri. (1991). Evidence that M3 muscarinic receptors in rat parotid gland couple to two second messenger systems. *The American Journal of Physiology*, 261(6 Pt 1), C1063-73.
70. Murakami, M., Shachar-Hill, B., Steward, M. C., ve Hill, A. E. (2001). The paracellular component of water flow in the rat submandibular salivary gland. *The Journal of Physiology*, 537(Pt 3), 899-906.
71. Ogawa, Y., Fernley, R. T., Ito, R., ve Ijuhin, N. (1998). Immunohistochemistry of carbonic anhydrase isozymes VI and II during development of the rat salivary glands. *Histochemistry and Cell Biology*, 110(1), 81-88.
72. Sterling, D., Reithmeier, R. A., ve Casey, J. R. (2001). A transport metabolon. functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/bicarbonate exchangers. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(51), 47886-47894.
73. Nguyen, H. V., Stuart-Tilley, A., Alper, S. L., ve Melvin, J. E. (2004). Cl(-)/HCO(3)(-) exchange is acetazolamide sensitive and activated by a muscarinic receptor-induced [ca(2+)](i) increase in salivary acinar cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286(2), G312-20.
74. Tandler, B. P., CJ. (1993). Structure of serous cells in salivary-glands. *Microscopy Research and Technique*, 26(1), 32-48.

75. Mednieks, M., Lin, M., ve Hand, A. R. (2008). Immunocytochemical analysis of cyclic AMP receptor proteins in the developing rat parotid gland. *Archives of Oral Biology*, 53(5), 429-436.
76. Garrett, J. R. (1987). The proper role of nerves in salivary secretion: A review. *Journal of Dental Research*, 66(2), 387-397.
77. Garrett, J. R., ve Kidd, A. (1993). The innervation of salivary glands as revealed by morphological methods. *Microscopy Research and Technique*, 26(1), 75-91.
78. Sharkey, K. A., ve Templeton, D. (1984). Substance P in the rat parotid gland: Evidence for a dual origin from the otic and trigeminal ganglia. *Brain Research*, 304(2), 392-396.
79. Garrett, J. R., Suleiman, A. M., Anderson, L. C., ve Proctor, G. B. (1991). Secretory responses in granular ducts and acini of submandibular glands in vivo to parasympathetic or sympathetic nerve stimulation in rats. *Cell and Tissue Research*, 264(1), 117-126.
80. Garrett, J. R., ve Anderson, L. C. (1991). Rat sublingual salivary glands: Secretory changes on parasympathetic or sympathetic nerve stimulation and a reappraisal of the adrenergic innervation of striated ducts. *Archives of Oral Biology*, 36(9), 675-683.
81. Borchers, A. T., Keen, C. L., ve Gershwin, M. E. (2002). Microgravity and immune responsiveness: Implications for space travel, 18(10), 889-898
82. Horneck, G. (1999). Impact of microgravity on radiobiological processes and efficiency of DNA repair. *Mutation Research*, 430(2), 221-228.
83. Muehrcke, R. C., Mandal, A. K., Gotoff, S. P., Isaacs, E. W., ve Volini, F. I. (1969). The clinical value of electron microscopy in renal disease. *Archives of Internal Medicine*, 124(2), 170-176.
84. Das, B., Cash, M. N., Hand, A. R., Shivazad, A., Grieshaber, S. S., Robinson, B., ve diğerleri. (2010). Tissue distribution of murine Muc19/smgc gene products. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 58(2), 141-156.
85. Das, B., Cash, M. N., Hand, A. R., Shivazad, A., ve Culp, D. J. (2009). Expression of Muc19/Smgc gene products during murine sublingual gland development: Cytodifferentiation and maturation of salivary mucous cells. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57(4), 383-396.

86. Zinzen, K. M., Hand, A. R., Yankova, M., Ball, W. D., ve Mirels, L. (2004). Molecular cloning and characterization of the neonatal rat and mouse submandibular gland protein SMGC. *Gene*, 334, 23-33.
87. Hendry, I. A. (1972). Developmental changes in tissue and plasma concentrations of the biologically active species of nerve growth factor in the mouse, by using a two-site radioimmunoassay. *The Biochemical Journal*, 128(5), 1265-1272.
88. Hirata, Y., ve Orth, D. N. (1979). Concentrations of epidermal growth factor, nerve growth factor, and submandibular gland renin in male and female mouse tissue and fluids. *Endocrinology*, 105(6), 1382-1387.
89. Schwab, M. E., Stockel, K., ve Thoenen, H. (1976). Immunocytochemical localization of nerve growth factor (NGF) in the submandibular gland of adult mice by light and electron microscopy. *Cell and Tissue Research*, 169(3), 289-299.
90. Simson, J. A., Hazen, D., Spicer, S. S., Murphy, R. A., ve Young, M. (1978). Secretagogue-mediated discharge of nerve growth factor from granular tubules of male mouse submandibular glands: An immunocytochemical study. *The Anatomical Record*, 192(3), 375-387.
91. Levi-Montalcini, R. (1966). The nerve growth factor: Its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells. *Harvey Lectures*, 60, 217-259.
92. Sabbadini, E., & Berczi, I. (1995). The submandibular gland: A key organ in the neuro-immuno-regulatory network? *Neuroimmunomodulation*, 2(4), 184-202.
93. Aloe, L., ve Levi-Montalcini, R. (1977). Mast cells increase in tissues of neonatal rats injected with the nerve growth factor. *Brain Research*, 133(2), 358-366.
94. Bischoff, S. C., ve Dahinden, C. A. (1992). Effect of nerve growth factor on the release of inflammatory mediators by mature human basophils. *Blood*, 79(10), 2662-2669.
95. Kannan, Y., Ushio, H., Koyama, H., Okada, M., Oikawa, M., Yoshihara, T., et al. (1991). 2.5S nerve growth factor enhances survival, phagocytosis, and superoxide production of murine neutrophils. *Blood*, 77(6), 1320-1325.
96. Barka, T. (1980). Biologically active polypeptides in submandibular glands. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 28(8), 836-859.

97. Hand, A. R., ve Jungmann, R. A. (1989). Localization of cellular regulatory proteins using postembedding immunogold labeling. *The American Journal of Anatomy*, 185(2-3), 183-196.
98. Mednieks, M. I., ve Hand, A. R. (1984a). Cyclic AMP binding proteins in saliva. *Experientia*, 40(9), 945-947.
99. Mednieks, M. I., ve Hand, A. R. (1984b). Microheterogeneity of rat parotid gland proteins after chronic treatment with isoproterenol. *Journal of Dental Research*, 63(2), 87-93.
100. Carlson, D. M. (1988). Proline-rich proteins and glycoproteins: Expression of salivary gland multigene families. *Biochimie*, 70(11), 1689-1695.
101. Carlson, D. M. (1993). Salivary proline-rich proteins: Biochemistry, molecular biology, and regulation of expression. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 4(3-4), 495-502.
102. Shaw, P., ve Schibler, U. (1986). Structure and expression of the parotid secretory protein gene of mouse. *Journal of Molecular Biology*, 192(3), 567-576.
103. Mirels, L., Miranda, A. J., ve Ball, W. D. (1998). Characterization of the rat salivary-gland B1-immunoreactive proteins. *The Biochemical Journal*, 330 (Pt 1), 437-444.
104. Geetha, C., Venkatesh, S. G., Dunn, B. H., ve Gorr, S. U. (2003). Expression and anti-bacterial activity of human parotid secretory protein (PSP). *Biochemical Society Transactions*, 31(Pt 4), 815-818.
105. Bekhor, I., Wen, Y., Shi, S., Hsieh, C. H., Denny, P. A., ve Denny, P. C. (1994). cDNA cloning, sequencing and in situ localization of a transcript specific to both sublingual demilune cells and parotid intercalated duct cells in mouse salivary glands. *Archives of Oral Biology*, 39(12), 1011-1022.
106. Girard, L. R., Castle, A. M., Hand, A. R., Castle, J. D., ve Mirels, L. (1993). Characterization of common salivary protein 1, a product of rat submandibular, sublingual, and parotid glands. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(35), 26592-26601.
107. Mullins, J. J., Mullins, L. J., Dunbar, D. R., Brammar, W. J., Gross, K. W., ve Morley, S. D. (2006). Identification of a human ortholog of the mouse dcpp

- gene locus, encoding a novel member of the CSP-1/Dcpp salivary protein family. *Physiological Genomics*, 28(1), 129-140.
108. Karn, R. C. (1998). Steroid binding by mouse salivary proteins. *Biochemical Genetics*, 36(3-4), 105-117.
109. Sun, G. S., Tou, J. C., Yu, D., Girtten, B. E., ve Cohen, J. (2014). The past, present, and future of national aeronautics and space administration spaceflight diet in support of microgravity rodent experiments. *Nutrition*, 30(2), 125-130.
110. Burdman, J. A., ve Goldstein, M. N. (1965). Synthesis and storage of a nerve growth protein in mouse submandibular glands. *The Journal of Experimental Zoology*, 160(2), 183-188.
111. Byyny, R. L., Orth, D. N., ve Cohen, S. (1972). Radioimmunoassay of epidermal growth factor. *Endocrinology*, 90(5), 1261-1266.
112. Bueker, E. D., Weis, P., ve Schenkein, I. (1965). Sexual dimorphism of mouse submaxillary glands and its relationship to nerve growth stimulating protein. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 118, 204-207.
113. Gresik, E. W., Schenkein, I., van der Noen, H., ve Barka, T. (1981). Hormonal regulation of epidermal growth factor and protease in the submandibular gland of the adult mouse. *Endocrinology*, 109(3), 924-929.
114. Gomez, E., Ortiz, V., Saint-Martin, B., Boeck, L., Diaz-Sanchez, V., ve Bourges, H. (1993). Hormonal regulation of the secretory IgA (sIgA) system: Estradiol- and progesterone-induced changes in sIgA in parotid saliva along the menstrual cycle. *American Journal of Reproductive Immunology*, 29(4), 219-223.
115. Leimola-Virtanen, R., Salo, T., Toikkanen, S., Pulkkinen, J., ve Syrjanen, S. (2000). Expression of estrogen receptor (ER) in oral mucosa and salivary glands. *Maturitas*, 36(2), 131-137.
116. Kasayama, S., Ohba, Y., ve Oka, T. (1989). Epidermal growth factor deficiency associated with diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(19), 7644-7648.

117. Mednieks, M. I., Szczepanski, A., Clark, B., & Hand, A. R. (2009). Protein expression in salivary glands of rats with streptozotocin diabetes. *International Journal of Experimental Pathology*, 90(4), 412-422.
118. Vugman, I., ve Hand, A. R. (1995). Quantitative immunocytochemical study of secretory protein expression in parotid glands of rats chronically treated with isoproterenol. *Microscopy Research and Technique*, 31(2), 106-117.
119. Matsuura, S., ve Hand, A. R. (1991). Quantitative immunocytochemistry of rat submandibular secretory proteins during chronic isoproterenol administration and recovery. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 39(7), 945-954.
120. Schwab, K. O., Heubel, G., ve Bartels, H. (1992). Free epinephrine, norepinephrine and dopamine in saliva and plasma of healthy adults. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 30(9), 541-544.
121. Takai, N., Yamaguchi, M., Aragaki, T., Eto, K., Uchihashi, K., ve Nishikawa, Y. (2004). Effect of psychological stress on the salivary cortisol and amylase levels in healthy young adults. *Archives of Oral Biology*, 49(12), 963-968.
122. Kirschbaum, C., ve Hellhammer, D. H. (1994). Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: Recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology*, 19(4), 313-333.
123. Mednieks, M., Khatri, A., Rubenstein, R., Burleson, J. A., ve Hand, A. R. (2014). Microgravity alters the expression of salivary proteins. *Oral Health and Dental Management*, 13(2), 211-216.

EKLER

Ek 1. Etik Kurul İzni



University of Connecticut Health Center

Office of Research and
Sponsored Programs

Dr. Arthur Hand
Professor, Craniofacial Sciences
MC-1610

April 1, 2008

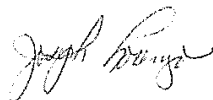
Dear Dr. Hand-

The University of Connecticut Health Center (UCHC) Animal Care Committee (ACC), which is our IACUC, received a protocol submitted by Dr. Maija Mednieks titled "Protein Expression in Salivary Glands: Effects of Extended Space Flight", ACC protocol 2008-423, which was discussed by the committee during its March 20, 2008 meeting.

Because live, vertebrate animal work in this protocol will be performed in Russia and not at UCHC, it was decided that the ACC did not have jurisdiction over the animal procedures of this protocol. However, the ACC had no issues with the procedures in the protocol that will be performed at UCHC.

If there is any other help or information you need, please feel free to contact me at 860-679-8199.

Sincerely,



Joseph Lorenzo, M.D.
Chair, UCHC Animal Care Committee

263 Farmington Avenue Bldg. 20
Farmington, Connecticut 06030-2806
Animal Care Committee
Telephone (860) 679-4129
Facsimile (860) 679-2670